

LIANARA TERESINHA MUMBACH BRANDENBURG

**MAPEAMENTO DA EXPRESSÃO TEMPORAL E ESPACIAL DA
PROTEÍNA ADAM23 E SUA PARTICIPAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO NEURAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Biologia Celular, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. ° Dr. ° Silvio Marques Zanata

**CURITIBA
2005**

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar este trabalho.
- Ao meu orientador Dr^o Silvio Marques Zanata, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e compreensão nos momentos difíceis e por sempre mostrar que eu seria capaz.
- A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, que com seus conhecimentos permitiram meu desenvolvimento científico. Especial agradecimento a: Prof^a Célia Regina C. Franco, Prof^o Silvio Sanches Veiga, Prof^a Lia Nakao, Prof^a Cloris Ditzel Faraco, Prof^o Cláudio Greca e a Prof^a Carolina Freire.
- A colega Valéria Togni do laboratório de Fisiologia da Comparação, pelo incentivo e amizade.

- A Prof^a Ida Gubert do departamento de Patologia Básica, pela amizade, incentivo e companheirismo sempre presentes.
- Aos colegas do curso de Pós-graduação, pelo companheirismo e amizade, em especial as amigas Cecília, Olga e Ana Isabel.
- A todos os colegas do laboratório de Neurobiologia, pelo auxílio durante os experimentos e por fazerem parte da minha história.
- A todos os meus amigos que tiveram muita paciência e sempre uma palavra de incentivo, em especial aos amigos do laboratório de Neurobiologia: Audrey, Cecília, Michele, Daniel, Aline, Estér, Cynthia e Tatiana.
- Aos novos integrantes do laboratório de Neurobiologia, que pelo pouco tempo passado junto, já contribuíram com sua sincera amizade. Sinceros agradecimentos a Camila, Flávia e Alexander.
- A todos os colegas e amigos da PUC-PR em Curitiba: Lidiane, Hellen, Valéria e João Vitor.

- A secretária do curso de pós-graduação, Marlene, pelo apoio e dedicação a todos nós, integrantes deste curso.
- Aos meus familiares, que me deram força e solidariedade nos momentos difíceis.
- Ao meu querido esposo Jorge Brandenburg por seu exemplo de dedicação a sua família e por seu exemplo como ser humano.
- À minha filha Thaís Byanca pela sua paciência e compreensão nos momentos de minha ausência.
- Aos integrantes do laboratório de Matriz Extracelular pelo apoio, amizade e pelas inúmeras contribuições ao meu trabalho.
- As colegas Cácia e Dione pelo intenso companheirismo e pela amizade sempre.

- Ao meu pai, Paulo Carlos, homem justo, exemplo de caráter e de honradez.
- À minha mãe, Oraides Gleci, alma caridosa e conciliadora, exemplo de maternidade, sempre disposta a resolver os problemas do mundo.
- Às minhas irmãs, Liane, Rosângela, Mirian e Maiara por me fazerem pertencer a esta adorável família.
- A todos aqueles que direta ou indiretamente incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho: **Muito Obrigada!**

DEDICO ESTE TRABALHO

**A DEUS, pai de infinita
bondade, que se faz
sempre presente,
encorajando-nos a
seguir em frente.**

**Ao Jorge, excelente
amigo e amado
esposo, que sempre
me encorajou e com
certeza meu maior
incentivador.**

**À Thaís Byanca, minha
adorável filha, que em
seus gestos carinhosos
e sinceros, me deram
forças para continuar.**

Ao Profº. Drº. Silvio Marques Zanata

**Pela amizade, respeito e carinho
sempre presentes, e, sobretudo pela
orientação firme, paciente e
dedicada.**

“Ria sempre, muito e alto.
Ria até perder o fôlego.
Lágrimas acontecem.
Agüente, sofra e siga em frente.
A única pessoa que acompanha você a vida toda é VOCÊ mesmo.
Esteja VIVO, enquanto você viver.
E lembre-se sempre que:
A vida não é medida pelo número de vezes que você respirou, mas
pelos momentos em que você perdeu o fôlego...
De tanto rir...
De surpresa...
De êxtase...
De felicidade...”
(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | X |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS | XII |
| RESUMO | XV |
| ABSTRACT | XVI |
| 1 – INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 A formação de processos neuronais – neuritogênese | 02 |
| 1.2 Integrinas | 08 |
| 1.3 Desintegrinas | 14 |
| 1.4 Laminina e neuritogênese | 24 |
| 2 – JUSTIFICATIVA | 26 |
| 3 – OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 Objetivo geral | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4 - MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 Animais Experimentais | 31 |
| 4.2 Anticorpos | 31 |
| 4.3 Linhagens Celulares | 32 |
| 4.4 Extratos Celulares | 33 |
| 4.5 Preparação de Membrana | 33 |
| 4.6 Preparação de frações protéicas a partir de precipitação sequencial com sulfato de amônio saturado | 34 |
| 4.7 Diálise | 34 |
| 4.8 Técnica SDS-PAGE | 35 |
| 4.9 Reação de “Western Blotting” | 36 |
| 4.10 Ensaio de Imunohistoquímica | 37 |
| 4.11 Ensaio de Adesão | 37 |
| 4.12 Ensaio de Imunofluorescência | 38 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.13 | Fragmento recombinante da proteína ADAM23 | 39 |
| 4.13.1 | Preparação de cepas BL21 de <i>E. coli</i> competentes eletricamente | 39 |
| 4.13.2 | Transformação de <i>Escherichia coli</i> eletro-competentes (cepa BL21) | 40 |
| 4.13.3 | Expressão da proteína ADAM23 em sistema heterólogo recombinante de <i>E. coli</i> | 40 |
| 4.13.4 | Protocolo de miniexpressão | 41 |
| 4.13.5 | Expressão e purificação da proteína ϵ His-ADAM23 | 41 |
| 5 | – RESULTADOS | 43 |
| 5.1 | Ensaio bioquímicos | 44 |
| 5.2 | Ensaio de Imunohistoquímica | 55 |
| 5.3 | Ensaio de adesão | 67 |
| 5.4 | Ensaio de imunofluorescência | 71 |
| 6 | – DISCUSSÃO | 73 |
| 7 | – CONCLUSÕES | 91 |
| 8 | – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 94 |
| 9 | – ANEXOS | 117 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| μg | Microgramas |
| μL | Microlitros |
| A172 | Glioblastomas de origem humana |
| ADAM | <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i> |
| Anti-ADAM23pep | anticorpo anti-peptídeo da sequência humana (546-570) da ADAM23 |
| APP | Proteína precursora amilóide |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| DAB | 3, 3-diaminobenzidina |
| DAPI | 4-hidroxi difenindrole |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| E12/ E14/ E16 | Embrião de 12, 14 ou 16 dias de gestação |
| EDTA | Etilenodiamino tetraacetato |
| EGF | Fator de crescimento epidérmico |
| <i>et al</i> | Expressão latina para demais colaboradores |
| GAP | Proteína associada ao crescimento |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| IgG | Imunoglobulina do tipo G |
| KDa | Quilodáton |
| Ln | Laminina |
| MDC | Domínio metaloprotease, desintegrina e domínio rico em cisteína |
| MEC/ ECM | Matriz extracelular |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| ml | Mililitros |
| MM | Milimolar |
| MMPs | Metaloprotease de matriz |

| | |
|----------------------------|---|
| N ₂ A/ Neuro 2A | Neuroblastoma de camundongo |
| N-CAM | Molécula de adesão celular neural |
| NGF | Fator de crescimento do nervo |
| NP-40 | Nonidet-nonionic P-40 detergent |
| P6 | Camundongo com 6 dias de nascimento |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PFA | Paraformaldeído |
| PMSF | Phenylmethane sulphonyl fluoride |
| PrPc | Proteína prion celular |
| RGD | Seqüências Arginina – Glicina – Asparagina |
| rpm | Rotações por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |
| SVMPs | Metaloprotease de veneno de cobra |
| T98G | Glioblastoma multiforme de origem humana |
| TBST | Solução salina tamponada com Tris e acrescida de Tween 20 |
| TEMED | N, N, N, N – Tetrametil etilenodiamina |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| Tris | Tris (hidroximetil) amino metano |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

- ILUSTRAÇÃO 01:** Diferenças entre as seqüências polipeptídicas dos domínios (desintegrina) da molécula ADAM23 humana e de camundongo 45
- FIGURA 01:** Anticorpo anti-peptídeo ADAM23₅₄₆₋₅₇₀ humana reconhece a proteína ADAM23 de camundongo 45
- FIGURA 02:** ADAM23 presente na fração 25% de amostras protéicas obtidas por precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 47
- FIGURA 03:** ADAM23 é diferencialmente purificada na fração 25% pelo método de precipitação protéica seqüencial 48
- FIGURA 04:** ADAM23 é diferencialmente expressa no sistema nervoso em desenvolvimento de animais recém-natos 49
- FIGURA 05:** ADAM23 é diferencialmente expressa no sistema nervoso de embriões E16 51
- FIGURA 06:** Expressão acentuada de ADAM23 no cerebelo de animais recém-natos 52
- FIGURA 07:** ADAM23 é diferencialmente expressa no cérebro de animais Swiss adultos 53

| | |
|---|-----------|
| FIGURA 08: Anticorpo anti-ADAM23 _{pep} humana reage especificamente com ADAM23 expressa em sistema recombinante de <i>E. coli</i> | 54 |
| FIGURA 09: Cerebelo de camundongos Swiss adultos em cortes transversais seriados corados com HE para averiguação da integridade celular | 56 |
| FIGURA 10: Cérebro de animais adultos em cortes transversais seriados corados com HE para averiguação da integridade celular | 57 |
| FIGURA 11: Condrócitos hipertróficos presentes em focos de cartilagem hialina em embriões de camundongos Swiss no estágio E14 | 58 |
| FIGURA 12: Expressão de ADAM23 na medula espinhal de embriões de camundongos Swiss no estágio E12 | 61 |
| FIGURA 13: Expressão de ADAM23 na medula espinhal de embriões de camundongos Swiss no estágio E14 | 62 |
| FIGURA 14: Expressão de ADAM23 no sistema nervoso em desenvolvimento de embriões de camundongos Swiss no estágio E16 | 63 |
| FIGURA 15: Ausência de expressão de ADAM23 em focos cartilaginosos presentes em embriões de camundongos Swiss no estágio E14 | 64 |
| FIGURA 16: Expressão de ADAM23 no cérebro de camundongos Swiss adultos | 65 |
| FIGURA 17: Expressão de ADAM23 no cerebelo de camundongos Swiss adultos | 66 |
| FIGURA 18: Adesão de células A172 semeadas sobre fibronectina | 68 |

| | |
|--|-----------|
| FIGURA 19: Adesão de células A172 semeadas sobre vitronectina | 69 |
| FIGURA 20: Ausência de adesão de células A172 semeadas sobre poços não tratados com moléculas de matriz extracelular | 70 |
| FIGURA 21: Incapacidade de reconhecimento do anticorpo anti-ADAM23pep humana pela proteína ADAM23 na sua forma nativa | 72 |

RESUMO

Adesão célula-célula e célula matriz extracelular, bem como o remodelamento da matriz pela ação de proteases, são vitais para processos normais como morfogênese tecidual e cicatrização de feridas, assim como verificados em estados patológicos tais como invasão de células tumorais e metástase. Recentemente, uma nova classe de moléculas de adesão tem sido descrita, sendo seus membros conhecidos por desintegrinas celulares – ADAMs, e possuem um domínio de interação a integrinas e outro de metaloprotease. As ADAMs têm sido implicadas na fusão de membranas celulares, liberação de fatores de crescimento, migração celular, assim como em processos de desenvolvimento muscular e fertilização. Um dos membros desta família denominado ADAM23 / MDC3 é predominantemente expresso no sistema nervoso sugerindo que a mesma possa funcionar como ligante da integrina $\alpha_v\beta_3$ em células de origem neural. Nosso grupo recentemente descreveu que o silenciamento do gene adam23 por metilação está envolvido na progressão de tumores de sistema nervoso. Devido a pouca descrição espacial e temporal desta proteína no sistema nervoso, procuramos avaliar a expressão diferencial da desintegrina ADAM23 em diferentes estágios de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Para tal objetivo foram utilizadas as técnicas de imunohistoquímica e Western Blotting empregando anticorpo policlonal gerado contra o peptídeo 546-570 da ADAM23 humana. Inicialmente foi possível mostrar que o anticorpo gerado contra a sequência humana se liga ao antígeno expresso tanto no cérebro de camundongos como em sistema heterólogo de *E. coli*. Desta forma o anticorpo anti-peptídeo foi utilizado como reagente específico no reconhecimento da ADAM23 expressa por camundongos. Para o isolamento parcial da ADAM23 de cérebros de camundongos foi empregada técnica de precipitação sequencial com sulfato de amônio. Foi possível observar que ADAM23 está enriquecida na fração 25% de saturação, comportamento esperado para uma proteína transmembrânica. Ainda empregando Western Blotting com preparação de membrana plasmática total de cérebro de camundongos foi mostrada uma expressão aumentada de ADAM23 em animais recém-nascidos (P6) quando comparada a animais adultos. Interessantemente quando se utilizam amostras de embriões (fração 25%) a presença de ADAM23 está ainda mais aumentada. Desta forma pode-se concluir que há um decréscimo da expressão de ADAM23 no sistema nervoso de camundongos conforme há evolução na maturação do sistema nervoso. Este achado sugere que esta proteína esteja envolvida com o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso. Espacialmente a ADAM23 possui expressão praticamente condicionada ao sistema nervoso, uma vez que outras estruturas não são reconhecidas pelo anticorpo anti-peptídeo. Há uma expressão diferencial no cérebro e no cerebelo dos animais, sendo que no cerebelo está mais expressa em animais P6 e no cérebro em animais adultos. Apesar destes resultados confirmarem os achados da literatura que implicam na expressão quase que exclusiva do antígeno no sistema nervoso, não se pode excluir que, em outras estruturas fora do sistema nervoso, o epítipo reconhecido pelo anticorpo possa estar escondido ou mesmo expresso em quantidades abaixo do nível de sensibilidade do método. Tomados em conjunto os resultados apresentados apontam para uma possível participação da proteína ADAM23 no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso.

ABSTRACT

ADAMs are transmembrane and multidomain proteins that contain a desintegrin and a metalloprotease activity. Their metalloprotease domain can induce ectodomain shedding and cleave extracellular matrix protein while desintegrin and cysteine-rich domains have adhesive properties. The ADAMs family has been implicated in the control of membrane fusion, cytokine and growth factor shedding, and cell migration as well as processes such as muscle development, fertilization, and cell fate determination. Up to now more than 19 *adam* genes were described, while many lack functional characterization. Our group recently described that the epigenetic silencing of ADAM23 member is related with breast cancer development and its downregulation may be involved in disease progression. Interestingly, ADAM23 has a high expression in central nervous system, particularly in cerebellum, cerebral cortex and occipital pole. While ADAM23 role in cell adhesion in neuroblastoma cell model was described, there is no clue about its role in neurite outgrowth or poor information about its expression during central nervous system development. Here we describe a new polyclonal antibody raised against a peptide corresponding to residues 546-570 from human ADAM23. This antibody recognizes the epitope present in whole molecule expressed in cultured human glioblastoma cell lines. Furthermore, we could show that this reagent was able to bind the same protein expressed both in mouse brain and *E.coli* heterologous system. Employing ammonium sulfate serial precipitation and crude brain extract from adult mouse we partially purify ADAM23 in 25% ammonium sulfate saturation fraction. This behavior agrees with a transmembrane protein located at cell surface. When we compare ADAM23 expression using crude brain extract from P6 (new born) and adult mice, its expression is increased in the former, but the highest expression is found in embryo (E16) samples. Then we conclude that there is a decreasing ADAM23 expression as central nervous system becomes developed. This result suggests that this protein is probably involved with CNS development and maturation. Immunohistochemical analysis showed that ADAM23 spatial distribution is apparently confined in CNS because other non-nervous system structures were not recognized by anti-peptide antibody. There is a differential expression between cerebrum and cerebellum during development, since ADAM23 expression increases and decreases in cerebrum and cerebellum, respectively, from P6 to adult mice. Although our results confirm some data in the literature, we can not exclude that, in the case of other tissues, peptide epitope could be buried or is too low to be detected with the anti-ADAM23 peptide. Collectively our results indicate a probable ADAM23 participation in CNS development and maturation.

I. INTRODUÇÃO

1.1. A FORMAÇÃO DE PROCESSOS NEURONAIS - NEURITOGÊNESE

A origem da maioria das células encontradas no sistema nervoso central maduro pode ser rastreada até células-tronco multipotentes no interior do neuroepitélio inicial. Estas células sofrem numerosas divisões mitóticas antes de amadurecerem em células progenitoras bipotenciais, que dão origem a células progenitoras neurais ou células progenitoras gliais. As células progenitoras neuronais dão origem a uma série de neuroblastos (KANDEL et al., 1995; ZIGMOND et al., 1999). Os primeiros neuroblastos bipolares possuem dois finos processos citoplasmáticos que fazem contato com a membrana limitante externa e com a borda central da luz do tubo neural. No processo de sua transformação em neuroblasto unipolar, um neuroblasto bipolar perde contato com a borda da luz do tubo neural. Os neuroblastos unipolares acumulam grandes massas de retículo endoplasmático rugoso (substância de Nissl) no citoplasma, e começam a emitir vários processos citoplasmáticos. Neste momento eles passam a ser conhecidos como neuroblastos multipolares. Suas principais atividades de desenvolvimento são o lançamento de processos axonais e dendríticos para fazerem conexões com outros neurônios ou órgãos terminais (GARCIA & FERNANDEZ, 1991; CARLSON, 1996; GILBERT, 2002; MOORE & PERSAUD, 2004).

O número e tipos de neurônios são regulados por uma ação coordenada de fatores intrínsecos e extrínsecos, mecanismos estes envolvidos na especificação neural e proliferação celular (LUCKENBILL-EDDS, 1997; ALBERTS et al., 1999; CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2001; CAMARERO et al., 2003).

O funcionamento do sistema nervoso é possível graças a duas propriedades cerebrais que estão muito desenvolvidas nos neurônios; a irritabilidade, pela qual os

neurônios captam com facilidade os estímulos que recebem, e a condutibilidade, que faz com que os efeitos destes estímulos viajem rapidamente através do corpo neuronal e seus prolongamentos (HIB, 2003).

Embora semelhantes em muitos aspectos, o crescimento de axônios e dendritos difere de maneiras fundamentais. Um neurito em processo ativo de alongamento recebe um capuz chamado cone de crescimento. Os cones de crescimento caracterizam-se por uma região expandida de citoplasma com inúmeras projeções em forma de espículas denominadas filopódios. A morfologia de um cone de crescimento ativo encontra-se em estado dinâmico, os filopódios se estendendo e retraindo regularmente, como se testassem o ambiente local (GUIDATO et al., 2003). Os cones de crescimento contêm várias organelas citoplasmáticas, mas muito da forma e função dos filopódios depende da grande quantidade de microfilamentos de actina que preenchem estes processos. Na presença de agentes que rompem os filamentos de actina, os filopódios se retraem e os cones de crescimento deixam de funcionar normalmente (CARLSON, 1996). Se os cones de crescimento seguem em frente, permanecem estáticos ou mudam de direção, depende em boa parte de sua interação com o ambiente local (SAITO et al., 1992; FINGER et al., 2003). Se o ambiente for favorável, um filopódio permanecerá estendido e aderido ao substrato, ao passo que outros filopódios no mesmo cone de crescimento sofrem retração. Dependendo da localização dos filopódios aderidos, o cone de crescimento pode conduzir o neurito ao qual está preso direto para frente ou alterar a direção do seu cone de crescimento (GILBERT, 1997; ZIGMOND et al., 1999; STRACHAN & CONDIC; 2003).

A forma de leque do cone de crescimento pode ser subdividida em uma região proximal e uma distal, que são facilmente distinguidas por sua aparência exterior e

estrutura interna. A região distal inclui os filopódios e bordas externas dos lamelipódios, caracterizando-se por apresentar actina fibrilar (actina F) e poucas organelas. A região proximal do cone de crescimento é consideravelmente grossa e sendo preenchida por mitocôndrias, endossomos e uma grande quantidade de vesículas limitadas por membrana. O largo número de mitocôndrias na região proximal ajuda a promover energia, consideravelmente consumida por movimento constante do cone de crescimento (CARLSON, 1996; GUIDATO et al., 2003). A grande quantidade de membrana presumivelmente promove um estoque de novas membranas que podem ser suplementadas para a superfície celular com o avanço do cone de crescimento, já endossomos sugerem considerável reciclagem de membrana já incorporada na superfície celular. Polirribossomos, que parecem incorporar aminoácidos tritiados em polipeptídios têm sido vistos nos cones de crescimento, aumentando a possibilidade de síntese local de proteínas, podendo ocasionalmente ajudar no estoque conforme a necessidade do cone de crescimento. De qualquer modo, a maioria das proteínas e organelas requeridas na extensão axonal, são fornecidas pelo corpo celular e podem empregar mecanismos de transporte axonal rápido (KANDEL et al., 1995; ZIGMOND et al., 1999).

Os cones de crescimento podem responder a gradientes de concentração de substâncias que sofrem difusão (ex., fator de crescimento do nervo-NGF) ou a campos elétricos locais. Glicoproteínas da matriz extracelular, como fibronectina e especialmente laminina, promovem fortemente adesão e o crescimento dos neuritos. Proteínas de membrana integrais nos neuritos, chamadas integrinas, ligam-se especificamente a seqüências arginina-glicina-asparagina (RGD) nas glicoproteínas e promovem adesão ao substrato que contém estas moléculas. Outras moléculas, como

a N-caderina e N-CAM, estão envolvidas na adesão intercelular em vários estágios da migração celular ou alongamento do neurito (GILBERT, 1997; LUCKENBILL-EDDS, 1997; ZIGMOND et al., 1999).

Embora se possa considerar que o cone de crescimento dirige a evolução do neurito, outros fatores têm importância para o alongamento dos axônios. O transporte axonal é essencial para o crescimento e manutenção de axônios ou dendritos. No processo intracelular, as substâncias produzidas no corpo celular do neurito são levadas para as extremidades desses podendo os mesmos ter alguns metros de comprimento no ser humano (KANDEL et al., 1995).

O citoesqueleto de sustentação de um axônio é um arranjo ordenado de microtúbulos e neurofilamentos. Microtúbulos são longos polímeros tubulares compostos de subunidades de tubulina. Conforme um axônio se estende a partir do corpo celular, subunidades de tubulina são transportadas ao longo do axônio e vão polimerizar na extremidade distal do microtúbulo. A reunião de neurofilamentos é organizada numa polimerização semelhante. O sítio destes acréscimos ao citoesqueleto fica próximo à base do cone de crescimento, o que significa que o axônio se alonga através de acréscimos à sua extremidade distal, e não por acréscimo à sua extremidade proximal, perto do corpo celular neuronal (KANDEL et al., 1995; ZIGMOND et al., 1999). Um fator que acompanha de modo característico o crescimento axonal é a produção de grandes quantidades de proteínas associadas ao crescimento (GAPs). Destaca-se particularmente entre elas a GAP-43, que serve como substrato para a proteína-quinase C e se concentra no cone de crescimento. Diversamente dos axônios, os dendritos contêm microtúbulos com polaridade em

ambas as direções e ainda não apresentam a proteína GAP-43. Um dos primeiros sinais de polaridade de um neurônio em desenvolvimento é a concentração de GAP-43 nos axônios em formação e seu desaparecimento nos processos dendríticos (CARLSON, 1996).

Sugere-se que o crescimento axonal é feito através de uma rota de sinais quimioatraentes e quimiorrepelentes produzidos por células do sistema nervoso bem como moléculas da matriz extracelular. Neste mecanismo estão envolvidos receptores específicos presentes no cone de crescimento que detectam o caminho e desenvolvem uma resposta axonal direta (ZIGMOND et al., 1999).

A chegada de um axônio na célula alvo inicia uma série de mecanismos morfológicos e neuroquímicos que criam uma estrutura conhecida como sinapse. A estabilização e manutenção de sinapses demonstram papel central na criação de circuitos neurais funcionais e requer eventos importantes, como especificação do destino neuronal, crescimento axonal e seleção do alvo. Desta forma, uma sinapse sugere contato inicial entre um axônio e célula alvo envolvida, elaborando posteriormente uma troca de sinais entre o neurônio e seu alvo, em que cada célula suporta e induz a diferenciação dos associados (GARTNER & HIATT, 1999; CORMACK, 2003).

Nos mamíferos, inclusive no ser humano, a maioria dos neurônios evolui antes do nascimento, mas são conhecidos exemplos de neurogênese pós-natal, citando-se neste caso, as células granulares do hipocampo, do córtex cerebelar e do bulbo olfatório, além das células olfatórias do epitélio olfatório nasal. Células gliais continuam seu desenvolvimento depois do nascimento, sendo que, enquanto continua o

crescimento dos axônios, começa o desenvolvimento dos dendritos (CORMACK, 2003; GENESER, 2003).

Quando um grupo de axônios chega até seu destino final, em princípio, freqüentemente, emite-se maior quantidade de ramificações terminais das que serão finalmente utilizadas. A eliminação destas ramificações colaterais adicionais ocorre pelo “recorte” das colaterais “restantes” e também em função da grande quantidade de neurônios que sofrem morte programada por apoptose. O propósito desta sobreprodução de neurônios e comunicações é sem dúvida aumentar a precisão das relações que deverão ser estabelecidas (CORMACK, 2003; HIB, 2003). A morte programada das células nervosas, como em todo o desenvolvimento fetal, é uma ligação fundamental com a evolução do sistema nervoso. O grau de apoptose é muito variável nas diferentes partes do sistema nervoso e possivelmente afeta até 90% dos neurônios do córtex cerebral, de modo diferente das condições para os interneurônios da medula espinhal, onde só uns poucos sofrem apoptose (GENESER, 2003).

1.2 INTEGRINAS

Um dos aspectos mais interessantes na análise do funcionamento dos organismos é a maravilhosa organização que rege a composição e estrutura de cada órgão e sistemas. A partir dos três folhetos que se formam durante diferenciação do blastocisto, o desenvolvimento embrionário determina a formação de um organismo completo e bem diferenciado. Dessa maneira, as células primordiais, muito similares em sua carga genética, determinando uma função e localização específica no corpo adulto, começam a aderir-se entre si, agrupam-se e iniciam um processo ativo de

multiplicação, mantendo a arquitetura e composição em condições normais. O contato intercelular requer a ativação de um mecanismo molecular, em que participam diversas proteínas e receptores de membrana. Evidências experimentais obtidas nos últimos 30 anos, indicam que uma das famílias de moléculas que mantém a integridade dos tecidos é a das integrinas (CHERESH & MECHAM, 1994; LODISH et al., 1998; PINKSTAFF et al., 1999; HYNES, 1992, 2002).

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembrânicas compostos de cadeias polipeptídicas α e β , ligadas não covalentemente. São identificados mais de 16 tipos de diferentes subunidades α e 10 variantes de cadeia β , que são combinadas entre si para formar mais de 20 tipos de heterodímeros ou isoformas. A possibilidade de múltiplas combinações oferece uma grande plasticidade a esta família de moléculas e distintas variedades mostram afinidade particular por componentes da matriz extracelular. Uma integrina pode reconhecer diferentes moléculas, de acordo com seu estado conformacional (CHERESH & MECHAM, 1994; CHEN et al., 1999). As interações heterofílicas com seus ligantes são dependentes de cátions divalentes, Ca^{+2} ou Mg^{+2} (QUARANTA & JONES, 1991; CHERESH & MECHAM, 1994; RIIKONEN et al., 1995; CATTERALL & CAWSTON, 2003).

Os complexos heterodiméricos das integrinas foram classificadas em subfamílias: β_1 a β_8 . A subfamília β_1 agrupa moléculas que funcionam como receptores para algumas proteínas que se encontram na matriz extracelular (MEC) e na superfície de outras células. As integrinas β_2 medeiam principalmente interações célula-célula, e não célula-matriz, pela interação com ligantes específicos, como as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos (WATANABE & SENDO, 2002). Desta forma,

integrinas β_2 permitem, por exemplo, que as células brancas do sangue sejam firmemente fixadas e atravessem o revestimento endotelial para o local da infecção. Indivíduos incapazes de sintetizar a subunidade β_2 , desenvolvem uma doença genética chamada de deficiência de adesão leucocitária e, como consequência, suas células brancas não possuem toda a família de β receptores e sofrem repetidas infecções bacterianas (WOLFE, 1993). A subfamília β_3 se encontra sobre a membrana das células endoteliais das plaquetas, dos megacariócitos e dos monócitos. Esta última família é conhecida como citoadesinas. Algumas destas atuam como receptores para vitronectina e fibrinogênio (CHERESH & MECHAM, 1994). A interação da β_3 integrina expressa na plaqueta com fibrinogênio ocorre durante o processo de coagulação do sangue (TAKADA et al., 1992; CHERESH & MECHAM, 1994), e indivíduos com deficiência genética desta integrina possuem a *doença de Glanzmann*, são portanto geneticamente deficientes de integrina β_3 funcional e como consequência sangram excessivamente (WOLFE, 1993).

Em geral os membros das classes β_1 e β_3 intervêm na adesão das células aos componentes da matriz extracelular, incluindo laminina, colágeno e fibronectina, sendo que a subfamília β_2 está mais relacionada com os contatos intercelulares. A maioria das integrinas comporta características comuns, como a presença de um domínio extracelular (80% ou mais da molécula) e uma porção intracelular de tamanho variável. O domínio extracelular contém alta concentração de cisteína, já a porção intracelular apresenta resíduos de tirosina passíveis de fosforilação. As porções extracelulares se associam para formar o receptor, enquanto o segmento intracitoplasmático da cadeia β fixa-se diretamente aos microfilamentos de actina, através de diversas proteínas

ligadoras de actina, como α -actinina, vinculina e tensina. Algumas integrinas, como $\alpha_6\beta_4$, se unem aos hemidesmossomos e aos filamentos intermediários. O segmento receptor das integrinas é bastante heterogêneo e reconhece diversas seqüências, como o tripeptídeo RGD (Arg-Gly-Asp). Neste caso citam-se $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (CHERESH & MECHAM, 1994) e as integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_2$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, como exemplo de receptores para o domínio RGD contido em diversos ligantes de integrinas. A afinidade da seqüência RGD por integrinas é dependente do estado embebido da fibronectina, ou seja, integrinas ligam-se a fibronectina via seqüência RGD, dependendo do grau de exposição deste domínio no contexto celular. Fibronectina é um constituinte abundante em diferentes tipos de matriz extracelular, estando geralmente associada com fibras colágenas e proteoglicanos específicos. Esta proteína induz os processos de adesão e migração celulares através da atração de uma subfamília de integrinas que reconhece a seqüência RGD da fibronectina, ao passo que outras reconhecem outros domínios e seqüências (LODISH et al., 1998), produzindo fenômenos biológicos semelhantes ou distinto daqueles.

Integrinas podem ligar-se a componentes da matriz extracelular tais como a laminina, fibronectina, colágeno e outras moléculas de superfície celular como os membros pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (IgSF) e caderinas (TAKAGI et al., 1997; NATH et al., 2000).

A união das integrinas a determinadas moléculas presentes na matriz extracelular e a lâmina basal modifica a atividade das células epiteliais, como nos aspectos que evidenciam a modulação da expressão genética, mediação do processo de mitose e prevenção do mecanismo de apoptose (morte celular programada). As

integrinas também intervêm na diferenciação celular em que células ectodérmicas basais, localizadas na epiderme, começam uma sequência de eventos, o que determina a sua conversão em queratinócitos (WOLPERT et al., 2000).

Integrina $\alpha_6\beta_1$ é considerada receptor para laminina, sendo expressa em estágios iniciais do desenvolvimento de camundongo em órgãos tais como miocárdio, epiderme, gônadas e alguns epitélios. Já no camundongo adulto é expressa em uma variedade de tecidos epiteliais, fibroblastos, células de Schwann e plaquetas. Estando presente nestas diversas linhagens celulares foi demonstrado que $\alpha_6\beta_1$ pode induzir motilidade destas células sobre laminina, o que já foi observado em células de Langherans, fibroblastos, células precursoras renais, células de melanoma, linfócitos e macrófagos. A habilidade de migração das células é crucial para processos biológicos normais, assim como os relacionados ao desenvolvimento embrionário, remodelação tecidual em estados patológicos e invasão de células metastáticas. Migração mediada por integrina sobre matriz extracelular é acompanhada por mudanças morfológicas características, tais como, a formação de lamelipódios, os quais são considerados protusões marcantes na borda celular. A força do direcionamento do movimento celular é obtida pela reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina guiando retrações ou extensões à frente da célula ao examinar o ambiente (NATH et al., 2000).

Integrinas são essenciais para o processo de embriogênese, onde células estão em contato com componentes da matriz extracelular e outras células, permitindo sua migração, adesão e diferenciação (CHERESH & MECHAM, 1994; DeHART et al., 2003). Estudos experimentais com moscas de fruta, mostram que a ausência de integrinas ocasiona severos defeitos na embriogênese, cujos tecidos apresentam

desorganização e células dispersas (GROOMS et al.; 1993). Evidenciou-se também a expressão destas moléculas protéicas no desenvolvimento renal (KREIDBERG & SYMONS, 2000), na sinaptogênese e adesão no cérebro pós-natal (NIKONENKO et al., 2003), no desenvolvimento inicial da musculatura dos membros em camundongos (BAJANCA & THORSTEINSDÓTTIE, 2002), no desenvolvimento do tubo neural (CARROLL et al., 2003) e no desenvolvimento de tecido cartilaginoso, onde as integrinas atuam como receptores para a proteína condroaderina da matriz cartilaginosa (CAMPER et al., 1997).

Dentre as inúmeras funções atribuídas à família de receptores denominada de integrinas, demonstra-se que estão presentes durante desenvolvimento embrionário, facilitando a migração das células da crista neural de *Xenopus*, sendo este processo mediado pela interação da $\alpha_5\beta_1$ com seu ligante, a fibronectina, via seqüência RGD (ALFANDARI et al., 2003; STRACHAN & CONDIC, 2003).

As integrinas diferem de receptores de superfície celular para hormônios e outras moléculas sinalizadoras solúveis porque se ligam aos ligantes com afinidade relativamente baixa e normalmente estão presentes a uma concentração de 10 a 100 vezes maior na superfície da célula. A ligação simultânea, porém fraca, a várias moléculas da matriz permite que as células explorem o ambiente sem perder sua ligação à matriz. Se a ligação fosse muito forte, as células iriam tornar-se irreversivelmente associadas à matriz e não teriam capacidade de se movimentar (ALBERTS et al., 1999; WOLPERT et al., 2000).

Muitas células estendem protusões finas e rígidas (filopódios) tanto na borda anterior como em outra parte de sua superfície. Essas protusões possuem 0,1 μm de

largura e 5 a 10 μm de comprimento e cada uma contém um feixe frouxo de 10 a 20 filamentos de actina também orientados com suas extremidades “mais” apontadas para fora. A extremidade avançada (cone de crescimento) de um axônio em expansão estende filopódios ainda mais longos, chegando a 50 μm de comprimento, que o auxilia na investigação do meio ambiente com a finalidade de encontrar a trilha correta para conduzi-lo ao seu alvo. Desta forma, integrinas também atuam neste processo, reconhecendo ambientes extracelulares favoráveis à extensão do axônio, permitindo assim a migração de precursores neuronais até seus destinos terminais e estabelecendo conexões coerentes entre os diversos feixes nervosos (LUCKENBILL-EDDS, 1997).

Integrinas α_4 medeiam importantes interações célula-célula e célula-matriz em uma variedade de tecidos adultos e em desenvolvimento. Experimentos sugerem o envolvimento da integrina $\alpha_4\beta_1$ no crescimento de axônio (neuritos) em ambos os neurônios centrais e periféricos. Além disso, integrinas α_4 potencialmente podem estar envolvidas nos estágios iniciais de neurogênese, tais como proliferação de neuroblastos, migração e determinação do destino celular e também podem demonstrar um papel importante na formação de axônios e dendritos em RGCs (*retinal ganglion cell*), além de serem também expressas no desenvolvimento de células vasculares da retina (HIKITA et al., 2003).

As integrinas são, portanto uma larga classe de receptores de superfície celular que se ligam a diferentes componentes da matriz extracelular, as quais também medeiam interações célula-célula. Este grupo de moléculas é expresso em uma grande variedade celular, podendo estas células expressar diferentes proteínas do grupo, e,

portanto ligar-se a diferentes moléculas da matriz extracelular (TAKADA et al., 1992; TAKAGI et al., 1997; LODISH et al., 1998), não só pela variabilidade de expressão mas também pela grande promiscuidade de afinidade, pois uma mesma integrina pode ligar diferentes componentes da matriz extracelular.

1.3 DESINTEGRINAS

Adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, bem como o remodelamento da matriz pela ação de proteases, são vitais para processos normais como morfogênese tecidual e cicatrização de feridas, assim como verificados em estados patológicos tais como migração e invasão de células tumorais e metástase. Uma grande variedade de proteínas de adesão e proteases são importantes nestes eventos. Famílias de moléculas de adesão de superfície celular ancoradas à membrana plasmática incluem caderinas, imunoglobulinas, selectinas, integrinas e sindecans (WOLFSBERG et al., 1995). Recentemente, uma nova classe de moléculas de adesão tem sido descrita, sendo seus membros conhecidos como desintegrinas celulares – ADAMs (KUNO et al., 1996; JONES & GROOMS, 1997; SAGANE, 1998, 1999; SCHLÖNDORFF & BLOBEL, 1999).

ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase Domains*) são únicas entre proteínas de superfície celular que possuem na mesma molécula domínios estruturais protéicos responsáveis por adesão e proteólise (BLACK & WHITE, 1998; SAGANE et al., 1998; IBA et al., 1999; SMITH et al., 2002; TOMVZUK et al., 2003). O nome desintegrina deve-se a ruptura da ligação de integrinas, com moléculas da matriz

extracelular e de receptores celulares a partir da competição pelo domínio desintegrina presente nas ADAMs (BLOBEL et al., 1992; POINDEXTER et al., 1999).

Todas as ADAMs codificam o domínio metaloprotease que é similar na sequência com as metaloproteases dependentes de zinco, as SVMPs (*snake venom metalloproteinase*). Todas as SVMPs são ativas proteoliticamente, mas quanto as ADAMs, nem todas possuem ativação proteolítica. O domínio metaloprotease das SVMPs contém o sítio ativo consenso com a sequência $\text{HEX}^1\text{X}^2\text{HX}^3\text{X}^1\text{GX}^1\text{XHD}$ (X^1 é tipicamente: um resíduo hidrofóbico, já X^2 é uma glicina ou um resíduo hidrofóbico e X^3 asparagina) (WESKAMP & BLOBEL, 1994; HITE et al., 1994; KINI, 1995; ZHOU et al., 1996; KINI et al., 1997; HURSKAINEN et al., 1999; JIA et al., 1996, 2000). A análise estrutural sugere que as 3 histidinas ligam-se ao zinco, já a glicina permite uma rotação e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico. O domínio metaloprotease das ADAMs 1, 8, 9 e 10 contém os resíduos do sítio ativo das SVMPs e assim são ativas cataliticamente. Já as ADAMs 2-7, 11, 22 e 23 codificam sequências diferentes neste domínio e apesar de estruturalmente similares, o sítio proteolítico não está ativo (WOLFSBERG et al., 1995; INOUE et al., 1998; NISHIWAKI et al., 2000; BRACHVOGEL et al., 2002).

O domínio desintegrina de algumas das ADAMs é provavelmente ligante de integrinas ou outros receptores específicos. Desintegrinas solúveis de veneno de cobra pertencentes à classe II das SVMPs são processadas proteoliticamente e conhecidas como ligantes de integrinas de aproximadamente 50-80 aminoácidos. Estas desintegrinas interagem com as integrinas através de sua alça desintegrina, com motivos estruturais de 30 aminoácidos que contém a sequência RGD de ligação as integrinas. Todas as SVMPs, mas nem metade das ADAMs possuem no domínio desintegrina (RGD), o resíduo carregado negativamente de ácido aspártico. Este

resíduo nesta posição pode ser crítico para a função de ligante de integrinas (WOLFSBERG et al., 1995; KRÄTZSCHMAR et al., 1996; LOECHEL et al., 1998; 1999; HALL & ERICKSON, 2003).

O domínio fusogênico potencial das ADAMs é rico em cisteína onde atua como um suposto peptídeo de fusão de membranas celulares (SMITH et al., 2002). Estes peptídeos possuem uma capa hidrofóbica e sua habilidade para esta função deve-se ao seu modelo de α -hélice com faces hidrofóbicas (WOLFSBERG et al., 1995). Já a cauda ou domínio citoplasmático é rico em prolina, serina, ácido glutâmico e/ou lisina e pode estar envolvida na oligomerização ou na sinalização (SAGANE et al., 1998). Os receptores de um domínio semelhante a EGF, domínio transmembrânico e citoplasmático nas ADAMs sugerem que estas moléculas podem servir como transdutoras de sinal entre o meio extracelular e intracelular via interações célula-célula e célula-matriz extracelular (LOECHEL et al., 1998; ROGHANI et al., 1999; JIA et al., 1996, 2000; KÄRKKÄINEN et al., 2000; LIU & SMITH, 2000; GAULTIER et al., 2002).

A regulação da atividade das ADAMs é um processo relativamente complexo. Quanto ao primeiro plano estrutural somente algumas ADAMs codificam metaloproteases potencialmente ativas ou moléculas fusogênicas, e nem todas codificam proteínas de adesão ativas. Transcrição de mRNAs de ADAMs são modulados temporal e posicionalmente. Exemplificando este caso, alguns mRNAs de ADAMs são específicos dos testículos, enquanto outros são conhecidos em uma variedade de tecidos (WERB, 1997). ADAMs podem ser reguladas também no plano protéico, havendo a possibilidade das mesmas formarem outras combinações de dímeros ou oligômeros. A ADAM 1 e 4 mostra padrão idêntico de distribuição tecidual,

evidenciando que estas podem ser complexas em alguns tipos celulares. (WOLFSBERG et al., 1995; SAGANE et al., 1998; HAM et al., 2002; ZHU et al., 2003).

Regulação da atividade metaloprotease das ADAMs pode ocorrer por um mecanismo chicote de cisteína, em que o pro-domínio cisteína ligante ao sítio ativo do zinco, o mantém no estágio inativo. ADAMs que codificam resíduos do sítio ativo metaloprotease, contém uma cisteína no seu pro-domínio que não está presente em ADAMs ausentes de histidinas ligantes de zinco (WOLFSBERG et al., 1995; SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

Até o momento 34 ADAMs com o domínio transmembrânico tem sido clonadas e seqüenciadas. ADAMs TS não estão presentes à membrana celular e contêm um motivo trombospondina adicional (BLACK et al., 1997; BEVITT et al., 2003). O domínio metaloprotease das ADAMs está também estabelecido em metaloproteases de matriz (MMPs), estando implicadas no processamento ou degradação de proteínas da matriz extracelular (ECM) (KURISAKI et al., 2002; RISE et al., 2002; BOISSY et al., 2003; DOENDES et al., 2003).

As ADAMs foram primeiro identificadas em espermatozóides de porquinho da índia (fertilinas α e β), mas tem sido estabelecidas em uma larga variedade de tecidos mamíferos assim como em tecidos de origem não mamífera tais como em *Xenopus*, *C. elegans* e *Drosophila* (WOLFSBERG et al., 1995; HUOVILA, 1996; ALLEN & GREEN, 1997; EVANS et al., 1997a; 1997b). Isto sugere que esta classe de proteínas é muito importante em células biologicamente normais e que toxinas de extremo semelhante, as SVMPs são uma variação patológica de um produto celular normal. Já foi demonstrado que o domínio desintegrina das fertilinas α e β está envolvido na ligação

do espermatozóide ao óvulo pela interação com a integrina $\alpha_6\beta_1$ (BIGLER et al., 1997; LIU & SMITH; 2000; RYBNIKOVA et al., 2002; HE et al., 2003; WHITE, 2003; SEALS & COURTNEIDGE, 2003).

ADAM31 é preferencialmente expressa em células de Leydig nos testículos, mas sua função não está relacionada à espermatogênese. Sugere-se que esta molécula protéica esteja demonstrando importante papel como suporte da função testicular. Interessantemente ADAM31 é também expressa em 4 tipos de epitélio especializado: região caudal do epidídimo, vasos deferentes, células parietais do estômago e nos túbulos contorcidos renais. Como esta ADAM possui a seqüência consenso do domínio metaloprotease, indica-se que também pode exercer a atividade proteolítica. Relacionando-se a presença desta ADAM nestes epitélios especializados, sua função associa-se com a estabilização e manutenção de gradientes iônicos e de nutrientes nestas células epiteliais (LIU & SMITH, 2000).

Todas as ADAMs mostram um domínio de organização comum e com quatro funções potenciais: proteólise, adesão, sinalização e fusão. *ADAM10/ kuz/SUP-17* foi primeiro identificada como um gene requerido para o desenvolvimento neural em *Drosophila*, proporcionando formação do SNC e SNP, requerendo somente um número limitado de células com potencial de diferenciação neural, já células vizinhas são prevenidas a adaptar-se a este fato por um processo de inibição lateral. Evidenciou-se que Kuz também é requerido para extensão axonal (FAMBROUGH et al., 1996; BLACK & WHITE, 1998; HALL & ERICKSON, 2003).

Algumas ADAMs possuem expressão generalizada como a ADAM9/ ADAM10/ ADAM15 e ADAM17, já muitas outras ADAMs tem mostrado expressão tecidual

específica: ADAM12 e ADAM19 no músculo, ADAM22 no cérebro e ADAM23 no cérebro e coração (GILPIN et al., 1998; ZHANG et al., 1998; CERRETTI et al., 1999; WESKAMP et al., 2002). O largo grupo das ADAMs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29 e 30) são predominantemente expressas em testículos e assim envolvidas na fertilização e espermatogênese (YUAN et al., 1997; CHOI et al., 2003). Em adição MDC/ ADAM11 é uma proteína com gene supressor de tumor e *kuzl*/ ADAM10 demonstra um importante papel na neurogênese (CERRETTI et al., 1999).

Distribuição regional da expressão de mRNA de ADAMs no SNC de camundongos difere consideravelmente. Enquanto a ADAM10, é expressa no cérebro humano adulto principalmente no tálamo, a ADAM11 é expressa no SNC humano nas regiões do hipocampo, tálamo, cerebelo, medula espinhal e córtex cerebral. A ADAM23 é expressa também nestas regiões, mas sendo mais precisa no córtex cerebral e tálamo. ADAM17 foi detectada somente no hipocampo. Isso mostra que algumas ADAMs possuem distribuição ubíqua no SNC enquanto outras possuem um padrão de expressão restrito (YAGAMI-HIROMASA et al., 1995; WU et al., 1997; KÄRKKÄINEN et al., 2000; WESKAMP et al., 2002). MADAM (*Mammalian* ADAM10) pode também degradar proteína básica mielínica (HOWARD et al., 1996; HUIJSDUIJNEM, 1998; GROOME et al., 1998; GILL et al., 2003; HU & SHELVER, 2003).

Em vertebrados, ADAM12 (meltrina α), 13 e 19 (meltrina β) são ADAMs bem caracterizadas que são expressas no desenvolvimento primordial, inicialmente pelo mesênquima. ADAM13, expressa no neuroectoderma e algumas células da crista neural em embriões de *Xenopus*, parecendo agir na remodelação da matriz extracelular durante migração de células da crista neural (CAI et al., 1998). ADAM19 de

camundongo é expressa em gânglios derivados das células da crista neural e cornos ventrais da medula espinhal durante neurogênese e sendo capaz de processamento proteolítico de neuregulina, um fator de crescimento envolvido na diferenciação de neurônios e glia derivados de células da crista neural e glia (RISE & BURKE, 2002). Além disso, foi demonstrado que esta proteína possui uma variante conhecida como mini meltrina β , caracterizada também pela presença do domínio desintegrina e metaloprotease. Estudos *in vitro* sugerem que esta nova isoforma de meltrina β tem papel no processo de diferenciação neuronal especialmente na neuritogênese (KURISAKI et al., 2002).

Tem sido caracterizada uma nova família de moléculas protéicas, as metaloproteases de matriz (MMPs), sendo estas inseridas em uma família de endopeptidases dependentes de zinco consistindo de no mínimo 16 enzimas distintas. Elas podem ser divididas em quatro grupos de acordo com as propriedades de seu domínio estrutural e especificidade ao substrato: collagenases, gelatinases, estromelisinases e MMPs típicas de membrana (MT-MMPs). Estas enzimas degradam componentes da matriz extracelular assim como colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanos, sendo sua atividade regulada por seus inibidores naturais, os inibidores teciduais de metaloproteases de matriz (TIMPs). Tem sido proposto o envolvimento das MMPs em vários processos fisiológicos e patológicos tais como ovulação, desenvolvimento, angiogênese, remodelação tecidual, involução, inflamação, invasão tumoral e metástase (McKIE et al., 1997; WU et al., 1997).

No que se refere ao sistema nervoso central, extensões especializadas da membrana plasmática de oligodendrócitos formam a bainha de mielina ao redor dos

axônios. Recentemente evidenciou-se uma proteína com atividade metaloprotease degradando a proteína básica mielínica (MBP), resultando em uma patologia denominada de demielinização (CHANTRY et al., 1999). Além do mais, o cone de crescimento neuronal e seu tipo de movimento são considerados processos responsáveis pelo crescimento de axônios ou dendritos e assim influenciam diretamente a transmissão sináptica. Para completar este papel é sugerido que o cone de crescimento é regulado por uma série de complexos bioquímicos ou mecanismos moleculares (SAITO et al., 1992).

X-ADAM13 (X de *Xenopus laevis*) tem potencial metaloprotease e desintegrina, assim como atividade de sinalização. Esta é expressa no desenvolvimento inicial do embrião, mais precisamente no mesoderma somítico e nas células da crista neural, além de papel fundamental durante diferenciação de mioblastos e migração de células da crista neural (YAGAMI-HIROMASA et al., 1995; ALFANDARI et al., 1997).

ADAM 8 (CD 156) tem sido descrito como uma glicoproteína expressa no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, predominantemente em neurônios e oligodendrócitos, e tendo portanto funções essenciais nas interações neurônio-glia (SCHLOMANN et al., 2000).

Em adição, a cauda citoplasmática de muitas ADAMs contêm 3 seqüências homólogas de sítios de ligação, sugerindo que podem interagir com moléculas de sinalização intracelular e ao citoesqueleto (HOWARD, 1996; ZHOU et al., 1996).

Estudos referentes a esta nova família de proteínas caracterizam um novo membro denominado de ADAM23/ MDC 3. Esta desintegrina exibe a típica estrutura dos membros da família, sendo predominantemente expressada tanto em cérebro adulto quanto fetal, sugerindo que a mesma possa funcionar como ligante de integrina

em células de origem neural. Foi mostrado, que este processo é mediado pela interação específica entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e uma pequena seqüência de aminoácidos na alça da desintegrina ADAM23 (CAL et al., 2000). Interessantemente tal interação é independente do domínio RGD, sugerindo que outra seqüência na ADAM seja responsável pela ligação integrina $\alpha_v\beta_3$ – ADAM23. Adesão máxima foi detectada na presença de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Mn^{+2} em concentrações fisiológicas, mas não na presença de Ca^{+2} . Células aderentes a substratos recobertos por ADAM23 recombinante exibem diferenças na morfologia quando comparadas com outras proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina. Estas diferenças incluem a presença de numerosas e pequenas protusões microscópicas nas células em crescimento, bem como uma distinta organização de filamentos de actina (CAL et al., 2000; SUN et al., 2004).

ADAM23 possui um domínio transmembrânico hidrofóbico e 8 sítios potencialmente glicosilados (N-ligados). A comparação de MDC3/ ADAM23 com outras desintegrinas celulares revelam uma seqüência similar de 52,2% com ADAM11, 33% com ADAM12, 30,9% com MDC9, 30.1% com MDC15 e 30% com outras ADAMs (SAGANE et al., 1998).

Recentemente foi identificada uma nova forma de ADAM23, a ADAM23 γ e duas novas isoformas a ADAM23 β e ADAM23 α , ambas apresentando-se como proteínas transmembrânicas no sistema nervoso central de humanos e camundongos, tanto em embriões como em adultos. Segundo a expressão da ADAM23 γ e ADAM23 β , sugere-se que não são expressas em outros tecidos exceto coração e cérebro. Neste contexto, ADAM23 poderia exercer seu papel em diferentes estágios de desenvolvimento e na

manutenção de funções neurais, onde modularia algumas interações celulares. A integrina $\alpha v\beta 3$ é abundante em células gliais radiais durante desenvolvimento, sendo portanto importante na migração neuronal. As interações entre $\alpha v\beta 3$ e ADAM23 γ são predominantes em estágios embriogênicos e pós-natais de desenvolvimento cerebral, mas desaparecendo no SNC de camundongos adultos (SUN et al., 2004).

Em doenças neurodegenerativas, a célula neuronal doente usualmente sofre influência da ativação de células gliais, astrócitos e micróglia. Ativação da glia envolve remodelação da matriz extracelular, adesão celular e sinalização da ECM por meio de “shedding” de citocinas, receptores de citocinas e fatores de crescimento. Proteinases da matriz extracelular (MMPs e ADAMs) são capazes de atuar nestas funções (SCHLOMANN et al., 2000).

Conclusivamente, a comunicação mediada por proteínas de adesão entre células individualizadas e entre células e matriz extracelular (EMC), bem como o processo de proteólise e remodelação de proteínas celulares e extracelulares, são essenciais para a manutenção da estrutura e função do SNC. Portanto, as proteínas ADAMs medeiam interações adesivas e proteólise, bem como possuem implicações potencialmente relevantes em neurobiologia (KÄRKKÄINEN et al., 2000).

1.4 LAMININA E NEURITOGÊNESE

Gradientes de substâncias quimioatraentes e quimiorrepelentes demonstram papel central no controle do desenvolvimento do cérebro. Através da influência de gradientes de substâncias solúveis que interferem no comportamento neural, pode-se

estudar os mecanismos moleculares e celulares do crescimento axonal (DERTINGER et al., 2002; CHEN et al., 2003).

Dertinger e colaboradores mostraram que a especificação axonal de neurônios hipocâmpais de rato em cultura, sob influência de gradientes diferenciais de Laminina, são orientados na direção de crescimento da concentração desta molécula, e, portanto desenvolvem suas características, polaridade estrutural e funcional em uma sequência estereotipada de eventos de desenvolvimento. Nestas etapas, sinais extracelulares estimulam rápido crescimento de um dos processos neurais menores de um neurônio não diferenciado, determinando formação e diferenciação de neuritos em contato com Laminina (DERTINGER et al., 2002).

A laminina (LN), uma glicoproteína heterotrimérica de 800-kDa formada por braços polipeptídicos curtos e longos a partir da associação de três diferentes cadeias (α , β e γ). A Laminina é considerada molécula crítica na formação da matriz extracelular, tendo sido identificadas 5 cadeias α , 3 cadeias β e 3 cadeias γ adicionais, os quais em combinação formariam potencialmente 45 isoformas de laminina (CHEN et al., 2003). Esta molécula foi descoberta em membranas basais, onde mostra importante papel na proliferação celular, diferenciação, migração e também em morte celular. No sistema nervoso central, LN tem sido mostrada para mediar diferenciações neuronais através de interações com as integrinas, caracterizadas por formação e extensão de neuritos, para promover migração de neurônios e também mediando regeneração axonal (LUCKENBILL-EDDS, 1997).

A ligação entre LN e proteína precursora amilóide (APP) foi mostrada, onde a interação entre o peptídeo β -amilóide (1-40) com matriz extracelular promove

crescimento de neuritos, sugerindo um papel fisiológico no cérebro (KOO et al., 1993). APP é o precursor do peptídeo amilóide envolvido na doença de Alzheimer (SELKOE, 1998) e possui algumas propriedades e homologias com a proteína prion celular (PrPc) (HSIAO, 1997) que é responsável por alguns tipos de doenças neurodegenerativas (MARTINS et al., 1997, 2001, 2002).

Foi mostrado pelo nosso grupo que a interação PrPc-LN é responsável tanto pelo crescimento (GRANER et al., 2000a) e manutenção do cone de crescimento (GRANER et al., 2000b).

Conclusivamente, evidências mostram que gradientes diferenciais de proteínas de matriz extracelular, em especial a laminina, em associação com proteínas transmembrânicas têm o potencial de influenciar o desenvolvimento inicial de neurônios, nos processos de diferenciação, migração e navegação axonal (MITCHELL et al., 2001; DERTINGER et al., 2002).

II. JUSTIFICATIVA

Interessantemente as células nervosas, em particular os neurônios, estão entre os tipos mais antigos de células animais especializadas. Sua estrutura não é semelhante à de nenhuma outra classe de células, e o desenvolvimento do sistema nervoso enfrenta problemas que não tem paralelo em outros tecidos. Um neurônio é extraordinário acima de tudo, por sua forma enormemente estendida, com longos axônios ou dendritos conectados através de sinapses com outras células (ALBERTS et al., 1999).

Sabe-se que o bloqueio de integrinas específicas inibe a neuritogênese sobre laminina (TOMASELLI et al., 1988,1990), entretanto a participação das desintegrinas em processo semelhante ainda não foi estudada. Além do mais, conhece-se pouco sobre a expressão da desintegrina ADAM23 em diversos tecidos. Desta forma, baseando-se em dados da literatura tem-se como enfoque central deste trabalho, avaliar e mapear a expressão temporal desta proteína em estágios iniciais do desenvolvimento do SNC e em estágios mais avançados, bem como avaliar a intensidade de expressão desta importante molécula em regiões distintas do SNC.

A obtenção de dados da expressão da proteína ADAM23 tanto espacialmente como temporalmente no sistema nervoso resultará sem dúvida em uma melhor compreensão do papel fisiopatológico funcional desta molécula. Tendo em vista que um dos principais desafios da neurociência é explicar os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento neural, ou seja, entender como os neurônios e dendritos crescem, encontram seus parceiros certos e estabelecem seletivamente sinapses com eles, para criar uma rede funcional, o presente trabalho mostra-se relevante neste contexto.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Levando-se em consideração que os dados da literatura quanto à distribuição espacial e temporal da proteína ADAM23 no sistema nervoso central (SNC) são ainda incompletos e minimamente conclusivos, o presente trabalho propõe:

- ✓ Avaliar a expressão temporal da proteína ADAM23 em diferentes estágios de desenvolvimento do SNC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a expressão e localização da proteína ADAM23 em embriões de camundongo através de ensaios imunohistoquímicos em diferentes fases do desenvolvimento;
- ✓ Analisar por ensaios bioquímicos (Western Blotting) a expressão temporal da desintegrina ADAM23 em animais de diferentes estágios de desenvolvimento (adultos, P6 e E16);
- ✓ Verificar a possível participação da proteína ADAM23 no processo de adesão celular;
- ✓ Verificar especificidade de reconhecimento do anticorpo antipeptídeo ADAM23 humana pelo antígeno em questão, a proteína ADAM23 recombinante de camundongo.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss nos estágios E12 , E14 e E16, animais adultos e recém-natos (P6) para obtenção tanto de material para os ensaios de imunohistoquímica como para a preparação de extratos protéicos.

Estes animais foram cedidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Todos os procedimentos envolvendo animais de experimentação foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal – Setor de Ciências – UFPR, a qual forneceu certificado de aprovação nº 103. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após profundamente anestesiados por éter etílico.

4.2 Anticorpos

Anticorpos policlonais foram gerados em coelhos da raça Neozelandesa após ciclo de cinco imunizações contra o antígeno de interesse (Bethyl Inc. Montgomery, Texas USA). O peptídeo correspondente aos resíduos 546-570 da seqüência humana da ADAM23 (número de acesso GENBANK: AB009672) foi quimicamente sintetizado (C N N T S C L F Q P R G Y E C R D A V N E C D I T) e conjugado com hemocianina como proteína carreadora. Ensaios de “Western Blotting” levados a cabo pelo nosso grupo, empregando extrato das linhagens humanas T98G e A172 (glioblastoma, COSTA et al., 2005) e MCF7 (mama, COSTA et al., 2004) comprovam a capacidade deste anticorpo no reconhecimento da proteína ADAM23 humana. Para o reconhecimento do epítopo do antígeno recombinante ADAM23 de camundongo foram empregados anticorpos anti-6His – (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) na diluição

1:2000. Anticorpo secundário anti – Ig coelho e anti – Ig camundongo acoplados a peroxidase de raiz forte (Amershan Co, Prscataway, USA) foram empregados na diluição 1:20.000 e 1: 10.000 respectivamente.

4.3 Linhagens celulares

Células N₂A/ Neuro 2A (neuroblastoma de camundongo) usadas nos experimentos de adesão e imunofluorescência foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2mM de L-glutamina, além de 1mM de piruvato de sódio.

A linhagem A172 (glioblastoma humano) foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 4 mM de L-glutamina e, sendo ainda ajustado para conter 1.5 g/L de bicarbonato de sódio e 4.5 g/L de glicose. Já a linhagem T98G (glioblastoma multiforme humano) foi mantida em meio MEM (*Minimum essential medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2mM de L-glutamina, sendo ainda ajustado para conter 1.5 g/L de bicarbonato de sódio e 1 mM piruvato de sódio. Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37° com atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade controlada a 95%.

Tanto a linhagem N₂A/ Neuro 2A, quanto às linhagens A172 e T98G foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mari Sogayar, IQ-USP.

4.4 Extratos Celulares

Células foram coletadas dos recipientes de cultura, lavadas 2 vezes com PBS (137mM de NaCl, 2.07mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, 1.8mM de KH₂PO₄) gelado e lisadas em tampão de lise (PBS acrescido de 1% de NP-40 e inibidores de protease Complete (Roche) por incubação no gelo por 30 minutos). Os lisados obtidos foram centrifugados a 14.000g por 10 minutos a 4°C, onde o sobrenadante foi armazenado para análise posterior em SDS-PAGE.

4.5 Preparação de Membrana

Quanto a esta etapa experimental, utilizou-se a técnica de Arvan et al., 1983 com ligeiras modificações. Foram portanto, removidos cérebros do crânio de camundongos tanto nos estágios embrionários quanto no estágio adulto. Estes cérebros após serem rapidamente lavados com PBS 1X, foram homogeneizados em tampão A (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% (320 mM) de sacarose, 5 mM EDTA e inibidores de protease, 10 mM de iodoacetamida, 1 mM de PMSF (*Phenylmethane sulphonyl fluoride*), 10 mM de 2-fenantrolina). O primeiro homogeneizado foi obtido em homogeneizador de tecidos com pistilo de teflon (B. Braun, Alemanha) a 600 rpm por 5 a 10 minutos a 4°C, sendo em seguida o homogeneizado centrifugado a 2000g (rotor JA-21– Beckman). Obteve-se neste momento o sobrenadante (Super I) e o precipitado, o qual foi novamente homogeneizado (900 rpm) por 5 a 10 minutos acrescido de nova fração de tampão A. O segundo precipitado foi descartado, enquanto os sobrenadantes (Super I e Super II) foram combinados e submetidos a uma centrifugação de 41.241g por aproximadamente 30 minutos, obtendo-se portanto um precipitado e sobrenadante, os quais foram armazenados para posterior análise por SDS-PAGE e Western Blotting.

4.6 Preparação de frações protéicas a partir de precipitação seqüencial com sulfato de amônio

Foi obtido extrato total após homogeneização de cérebros e cerebelos de camundongos adultos, recém-natos e embriões de 16 dias em tampão contendo 50mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.2% de deoxicolato de sódio, 0.5% de Triton X-100, 1mM de PMSF, 10mM de EDTA, 10mM de iodoacetamida, 10mM de 2-fenantrolina, e subsequente centrifugação a 12.000g por 30 minutos, a 4°C. O material obtido foi submetido a precipitações sucessivas de 15%, 25%, 35%, 45% e 55% com sulfato de amônio saturado, sendo os precipitados obtidos centrifugação a 12.000g por 25 a 30 minutos, a 4°C. Amostras protéicas assim obtidas, foram dialisadas contra PBS 1X (item 4.7), aliquotadas e analisadas por SDS-PAGE e “Western Blotting”.

4.7 Diálise

Amostras protéicas obtidas pelo método de precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado foram dialisadas contra 4 litros de tampão PBS pH 7.4 (137mM de NaCl; 2.07mM de KCl; 10mM de Na₂HPO₄; 1.8mM de KH₂PO₄) mantido a 4°C. Foram realizadas 2 trocas do mesmo tampão, sendo a primeira diálise obtida em 2 horas e a segunda procedida por 16 horas. A concentração protéica após diálise foi mensurada através do método de Bradford, (BRADFORD, 1976), em seguida aliquotadas e armazenadas a -20°C.

4.8 SDS-PAGE

Os procedimentos eletroforéticos em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) foram realizados em equipamento padrão nacional com cubas de acrílico e

placas de vidro 20 x 20 cm e/ou 9,5 x 9,5 cm. As concentrações de acrilamida para os géis de separação foram de 6% e 7,5% conforme finalidade do experimento. Para o gel de empilhamento foram usados 4% de acrilamida (Bio rad) em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS (Synth). Para os géis de separação, as concentrações de acrilamida variam conforme descritas acima, dissolvidas em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, contendo 0,4% SDS e agentes catalizadores da polimerização da acrilamida, em ambos os géis, foram utilizados persulfato de amônio (Bio Rad) e N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina –TEMED (Pharmacia Biotech). As proteínas utilizadas nos experimentos foram diluídas em tampão de amostra redutor na proporção de 4:1, este contendo Tris-HCl 62mM, pH 6,8, 0,2% de SDS, glicerol 10% (MERCK), azul de bromofenol 0,005% (Riedel) e β -mercaptoetanol 50mM (Sigma) (agente redutor); além disso na separação de proteínas em condições redutoras, a mistura amostra/ tampão foi fervida por 5-10 minutos.

As amostras foram aplicadas nos géis acompanhadas de marcadores de massas moleculares (Sigma), constituídos de 6 proteínas com as respectivas massas moleculares, 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 kDa. A separação eletroforética foi realizada em corrente de 15 mA até o momento da entrada das proteínas no gel de separação, em seguida a amperagem aplicada foi de 30 mA, sendo neste momento constante até que a frente de migração chegasse ao ânodo.

4.9 Reação de “Western Blotting”

As proteínas dos extratos totais celulares, preparação de membrana de cérebro ou precipitação seqüencial de amostras do SNC com sulfato de amônio saturado foram

separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6% e 7,5% contendo SDS (SDS-PAGE – item 4.8).

As proteínas resolvidas por SDS-PAGE foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (0,45 μ m - Schleicher & Schuell, Alemanha) durante 16 horas sob voltagem constante de 25 V, não ultrapassando amperagem de 90 mA, sendo a transferência feita no sistema de tanque em tampão de transferência (192 mM de glicina (Merck), 25 mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Para averiguação da eficiência de transferência as membranas foram coradas com solução de vermelho Ponceau (Sigma).

As membranas foram então bloqueadas (durante 2 horas) com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) e incubadas com anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio a 4°C durante 16 horas. As membranas, após 3 lavagens de 10 minutos com TBST, foram incubadas com anticorpo secundário apropriado em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram reveladas com substrato adequado para reação quimioluminescente (West Pico, Pierce). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto a membrana até obtenção do sinal adequado.

4.10 Ensaio de Imunohistoquímica (mapeamento da expressão em diversos tecidos)

Os cortes de parafina foram processados para a reação de imunohistoquímica indireta com o método de revelação pela peroxidase, seguindo protocolo já

padronizado no laboratório. Os cortes foram reidratados, imersos em PBS e em solução de PBS contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), para inibição de peroxidases endógenas do tecido. A seguir os cortes foram incubados em meio contendo PBS/BSA (*Bovine Serum Albumine*) para redução de marcação inespecífica. Seguiu-se a incubação dos cortes em câmara úmida com anticorpo que reconhece a proteína ADAM23. Esta incubação foi feita por um período não superior a 16 horas a 4°C. Após este período os cortes foram novamente lavados em PBS e então realizada a segunda incubação, utilizando-se anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase. A incubação foi realizada num período de 1,5 horas em câmara úmida em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram processados para revelação da peroxidase utilizando-se solução de DAB (3,3-diaminobenzidina) em PBS e peróxido de hidrogênio. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer, desidratados e montados.

4.11 Ensaio de Adesão (participação funcional da ADAM23 na adesão celular)

GRANER et al., 2000b

Células A172 previamente cultivadas com meio DMEM acrescido de 10% de SFB foram utilizadas neste tipo de ensaio. Inicialmente, à placa de 96 poços foi aplicado substrato específico, diluído em PBS 1X, fibronectina (15µg/ poço) e vitronectina (15µg/ poço), repousando por \pm 16 horas a 4°C. Seguiu-se com lavagem dos poços com PBS 1X tamponada e aplicação de 200µl de PBS contendo BSA 1%, com tempo de bloqueio de 1 a 2 horas (37°C). Poços pré-lavados com PBS e já contendo células com meio DMEM sem SFB foram incubadas por 1 hora com anticorpo

antipeptídeo ADAM23 humana, posteriormente fixadas com PFA 3% e coradas com 0,5% de cristal violeta em metanol. A solução corante foi retirada e o seu excesso removido por sucessivas lavagens com PBS 1X. A eluição do corante contido nas células é procedida com 0,1M de citrato de sódio pH 4.2 acrescido de 50% de etanol absoluto.

4.12 Ensaio de Imunofluorescência

Células da linhagem A172 foram semeadas sobre lâminas de vidros acopladas a câmaras de poliestireno (Lab-tek, glass-slide, 8 chambers, Nunc Co.). As células foram cultivadas por 2 dias em meio RPMI contendo 10%SFB, o meio de cultivo retirado, as células lavadas 3 vezes com PBS seguida de fixação por 30 minutos, a temperatura ambiente, com solução 2% de paraformaldeído em PBS. O material foi então incubado com solução 0,1M de glicina por 3 minutos, lavado com PBS e os sítios não específicos bloqueados com solução 1% de BSA em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram incubadas com anticorpo primário anti-ADAM23 pep por 1 hora (1:50, diluído em BSA-PBS), lavadas 5 vezes com PBS e subseqüentemente incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à FITC (1:250). Após novo ciclo de lavagem foi feita uma incubação de 5 minutos com DAPI (0,3 μ M diluído em PBS) seguida de lavagem em PBS (1 vez) e montagem em meio de conservação Fluoromount-G. As lâminas montadas foram observadas sob microscopia fluorescente confocal (Confocal Radiance 2,100 – Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) acoplada a objetivas Plan-Apochromatic - Nikon-Eclipse E800 e software apropriado (Laser Sharp 2000).

4.13 Fragmento recombinante da proteína ADAM23

4.13.1 Preparação de cepas BL21 de *E. coli* competentes eletricamente

As cepas de *E. coli* foram preparadas segundo o protocolo descrito por Sambrook et al. e que consiste nas seguintes etapas: 5 mL de LB foram inoculados com uma colônia de *E. coli* cepa BL21 e cultivadas por 16 horas a 37 °C com agitação (pré-cultura).

Em seguida, 1 mL da pré-cultura foi utilizado para inocular 100 mL de LB. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação até a absorbância 0,4 – 0,6 (aproximadamente 3 - 4 horas). Após esse tempo a cultura foi resfriada no gelo por 10-15 minutos, e as células coletadas por centrifugação a 4000g por 5 minutos a 4 °C. Então o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas no mesmo volume inicial em água deionizada previamente autoclavada e resfriada. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 16000g por 10 minutos e o sedimento foi ressuspensado em metade do volume original com uma solução de glicerol 10% (v:v). A suspensão celular foi novamente centrifugada por 10 minutos a 16000g, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas num pequeno volume de glicerol 10% no gelo por duas horas e armazenada a -70 °C em alíquotas 100 µL em tubos de microcentrífuga.

4.13.2 Transformação de *Escherichia coli* eletro-competente (cepa BL21)

As células competentes (100 µl) foram retiradas do freezer -70°C e descongeladas lentamente em gelo. Após o descongelamento, foi adicionado aproximadamente 10ng do plasmídeo de interesse, ficando as células incubando no

gelo durante 1 minuto. Após isto, as células foram submetidas a choque elétrico (corrente de 1.40 kV em eletroporador – Bio Rad – Hercules – U.S.A), para a introdução do DNA na célula. Após o choque elétrico, foi adicionado as células 800µl de meio LB e esta cultura foi incubada a 37 °C sob agitação leve por uma hora para recuperação das células.

Após a recuperação das células, a cultura foi plaqueada em meio sólido (LB-Ágar) contendo antibiótico apropriado na concentração de 100µg/mL (o plasmídeo pET32 possui um gene que codifica resistência a ampicilina, por isso, as células, após a transformação, são cultivadas em meio LB-Ágar contendo o antibiótico ampicilina).

4.13.3 Expressão da proteína ADAM23 em sistema heterólogo recombinante de *E. coli*.

A partir do vetor de expressão pET32-ADAM23 contendo os domínios desintegrina e metaloprotease (Zanata et al., dados não publicados), bactérias de cepa não patogênica de *E. coli* (BL21) foram transformadas e então cultivadas a fim de se obter a proteína recombinante.

4.13.4 Protocolo de miniexpressão

Primeiramente, foi realizada uma miniexpressão com a finalidade de se identificar às colônias com mais alta expressão protéica. Uma colônia recombinante,

foi inoculada em 2 mL de meio LB/Amp e cultivada durante 16 horas a 37°C (pré-inóculo). Em seguida, 200 µl do pré-inóculo foram inoculados em 2 tubos contendo 5 ml de meio LB/Amp. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação até a absorbância de 0,4 – 0,6 a 37 °C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM as culturas. As culturas foram incubadas a 37°C por mais quatro horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000g por 5 minutos. As células foram lisadas em tampão de lise desnaturante (100mM NaH₂ PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Uréia, pH 8,0), centrifugadas e incubadas com 15µl de resina de Níquel-NTA (matriz cromatográfica de agarose capaz de se ligar à etiqueta de seis histidinas da proteína recombinante) durante 16 horas a 4°C. Então, a resina, com a proteína ligada, foi coletada por centrifugação, e o sobrenadante (void) foi guardado para posterior análise. A resina foi lavada com tampão de lavagem (igual ao tampão de lise, mas com pH 6,3) e a proteína foi eluída com tampão de eluição (idem tampão de lise, com pH 4,5). A proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE e corada com Coomassie.

4.13.5 Expressão e purificação da proteína ₆His-ADAM23

Clones com alta taxa de expressão da proteína ADAM23 foram expandidos em 500 mL de meio de cultura líquido, com agitação, a 37°C. Quando as culturas atingiram a absorbância de 0,4 – 0,6, foram induzidas à expressão utilizando 1 mM de IPTG, deixando-se então as células crescerem por mais quatro horas. O meio de cultura foi centrifugado e as células utilizadas para a purificação.

As células foram ressuspensas em solução de lise desnaturante e submetidas à pressão física em prensa de French. O extrato bacteriano obtido foi clareado por

centrifugação (12000g por 20 minutos) e então submetido à cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), em tubo de poliestireno, por 12 horas a 4°C. A resina foi transferida a uma coluna e lavada com tampão de lise desnaturante contendo 10 mM de imidazol, para que proteínas fracamente ligadas, por possuírem histidinas sequenciais, se desligassem da coluna e diminuíssem a contaminação da proteína de interesse. As proteínas foram então eluídas com 250 mM de imidazol em tampão de lise e guardadas em alíquotas a -20°C.

Amostras da proteína purificada foram separadas por eletroferese em gel de poliacrilamida desnaturante e redutor (SDS-PAGE), transferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à reação de immunoblot com anticorpo anti-₅His (Invitrogen Co).

Foi necessário dialisar a proteína contra 6 litros de tampão PBS pH 7.4 (137 mM NaCl, 2,07 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄) para a remoção da uréia. A concentração da proteína após a diálise foi medida pelo método de Bradford (1976).

V. RESULTADOS

5.1 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Proteínas obtidas por preparação de membrana de cérebro foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6% contendo SDS. As proteínas separadas foram submetidas a reação de “Western Blotting”, como descrito no item 4.9 de materiais e métodos. Na figura 1 pode ser observado que tanto o soro bruto (canaleta 1) como IgG purificada deste soro (canaleta 3) reagem fortemente com a ADAM23 expressa no cérebro de camundongos adultos. Menor reatividade foi observada quando maiores diluições da IgG purificada foram empregadas no mesmo tipo de ensaio (canaletas 4 e 5, diluição 1:500 e 1:1000 respectivamente). A ausência de reatividade obtida quando soro não imune de coelho (canaleta 2) é utilizado mostra que o anticorpo primário reconhece especificamente o antígeno de interesse. Além disso, o soro pré-imune do coelho imunizado com o peptídeo da ADAM23 humana (dados não mostrados) também não apresenta reatividade com nenhum antígeno possuidor do padrão eletroforético de migração da ADAM23.

A capacidade de reconhecimento do anticorpo anti-peptídeo ADAM23 humana pelo antígeno homólogo de camundongo se deve ao fato de que o domínio (desintegrina) da ADAM23 reconhecida possui apenas 2 aminoácidos diferentes em toda a sua extensão, o que demonstra provável manutenção do epítipo reconhecido pelo anticorpo. A ilustração 01 evidencia as diferenças existentes entre as cadeias protéicas expressas por humanos e camundongos, onde a troca destes aminoácidos (prolina, serina e ácido glutâmico) não interfere no reconhecimento do anticorpo pelo antígeno de interesse.

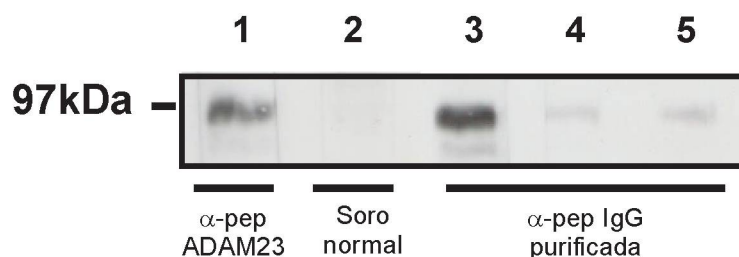


FIGURA 1: Anticorpo anti-peptídeo ADAM23₅₄₆₋₅₇₀ humana reconhece ADAM23 de camundongo. Proteínas (620 µg/ canaleta) oriundas de preparação de membrana de cérebros de camundongos adultos foram resolvidas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida à reação de Western Blotting. Soro bruto (canaletas 1-2) ou imunoglobulina do tipo G (IgG) purificada do soro hiperimune (canaletas 3-5) foram incubados com as membranas. Tanto o soro anti-peptídeo ADAM23 humana (canaleta 1 na diluição de 1:500) como a IgG purificada deste soro (canaleta 3 na diluição de 1:100) reagiu fortemente com antígeno correspondente a ADAM23 de camundongo. Apesar de evidenciar menos intensamente o antígeno, diluições maiores da preparação de IgG (1:500 e 1:1000, canaletas 4 e 5 respectivamente) continuam reagindo com o antígeno. Nenhuma reatividade foi observada no controle negativo empregando soro não imune de coelho (canaleta 2), na diluição de 1:500.

| |
|---|
| <p>CNNTSCLFQ<u>P</u>RGYECRDAVN<u>E</u>CDIT (Seqüência humana)</p> <p>CNNTSCLFQ<u>S</u>RGYECRDAVN<u>S</u>CDIT (Seqüência murina)</p> |
|---|

ILUSTRAÇÃO 01: Diferenças entre as seqüências polipeptídicas dos domínios (desintegrina) da molécula ADAM23 humana e de camundongo. Nota-se que há apenas 2 resíduos diferentes nestas seqüências, onde a troca de uma prolina por uma serina e de um ácido glutâmico por outra serina, não interferem no reconhecimento do antígeno de interesse.

Na tentativa de conseguir amostras protéicas enriquecidas em ADAM23, procurou-se estabelecer um protocolo para sua purificação a partir de extratos de cérebro e cerebelo de camundongo. Desta forma, optou-se pela técnica de precipitação protéica seqüencial com sulfato de amônio saturado (HARLOW & LANE, 1998).

Analisando-se as figuras 2 e 3, pode-se observar que o antígeno ADAM23 está presente na fração 25% de amostras cerebrais adultas, obtidas por esta técnica de precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado. Já as outras frações (15%, 35%, 45% e 55%) reagidas com antipeptídeo ADAM23 humana, mostram ausência de reação deste anticorpo pelo antígeno específico. Neste mesmo ensaio, utilizou-se também amostras protéicas obtidas de extrato total de cérebros adultos, o que mostrou reação positiva em relação à expressão da proteína em estudo, apesar de apresentar uma banda de menor intensidade na altura de 92kDa quando comparada com a banda identificada na mesma altura na fração 25%. Isto comprova que amostras obtidas por preparação de frações protéicas a partir de precipitação seqüencial de sulfato de amônio saturado estão mais enriquecidas com antígeno de interesse do que extrato o total bruto.

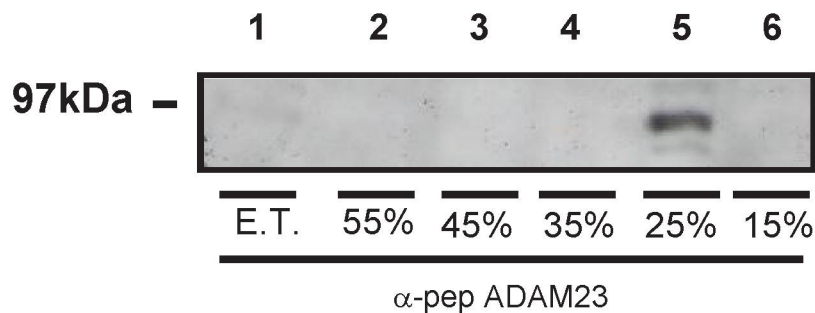


FIGURA 2: ADAM23 presente na fração 25% de amostras protéicas obtidas por precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado. Extrato protéico de tecidos do sistema nervoso central (cérebro + cerebelo) de camundongos adultos, submetido a precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio saturado, 55%, 45%, 35%, 25% e 15% (canaletas 2 - 6). As proteínas das diferentes amostras foram resolvidas eletroforéticamente (100µg/ canaleta) em gel de poliacrilamida à 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida a reação de Western Blotting. Soro bruto (canaleta 1-6) foi incubado com a membrana (diluição de 1:500). Pode-se observar presença do antígeno ADAM23 de forma acentuada na fração 25%, enquanto que as outras frações não apresentam antígeno de interesse. A parca reação do anticorpo α-pep ADAM23 sobre a mesma quantidade de extrato total bruto (100µg) evidencia o sucesso deste método no enriquecimento do antígeno de interesse na fração 25%.

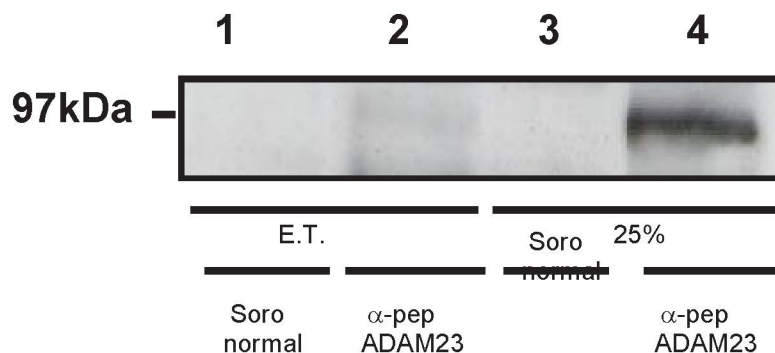


FIGURA 3: ADAM23 é diferencialmente purificada na fração 25% pelo método de precipitação protéica seqüencial. Amostras protéicas tanto de extrato total (canaletas 1 e 2) quanto da fração 25% (canaletas 3 e 4) provenientes do sistema nervoso central de camundongos adultos (cérebro e cerebelo), obtidas por precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado, foram resolvidas (100µg/ canaleta da fração 25% e 200µg/ canaleta do extrato total) eletroforéticamente em gel de poliacrilamida à 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida a reação de Western Blotting. Soro bruto (canaletas 2 e 4) foi incubado com as membranas, na diluição de 1:500. Como controle negativo foi utilizado soro não imune de coelho (canaletas 1 e 3). Observa-se que o anticorpo anti-peptídeo ADAM23 humana reconhece fortemente o antígeno correspondente próximo a altura de 97kDa na fração 25%, sendo a expressão menos acentuada no extrato total (comparar canaletas 2 e 4). O que evidencia enriquecimento do método de precipitação na obtenção de moléculas de interesse.

Na tentativa de melhor investigar a expressão da ADAM23 durante o desenvolvimento e maturação do SNC procurou-se avaliar a presença desta proteína no cérebro de camundongos recém-natos (P6). Desta forma preparação de membrana de cérebros, tanto de recém-natos (P6) como de adultos (mais de 3 meses pós-nascimento), foram submetidas à reação de Western Blotting.

Como pode ser observado na figura 4, o anticorpo anti-peptídeo humano se liga ao antígeno ADAM23 presente tanto no cérebro de recém-natos como no de adultos. Interessantemente, a reação parece ser mais intensa no antígeno apresentado nos

cérebros de recém-natos sugerindo uma expressão aumentada durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

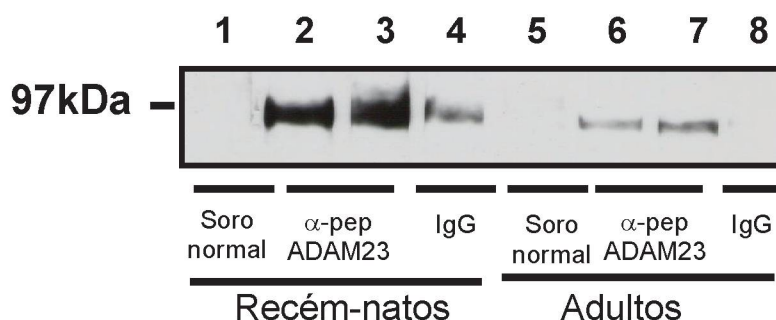


FIGURA 4: ADAM23 é diferencialmente expressa no desenvolvimento do sistema nervoso. Proteínas da preparação de membrana de cérebros de camundongos recém-natos (canaletas 1-4) e adultos (canaletas 5-8) foram resolvidas (600 µg/canaleta) eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida à reação de Western Blotting. Soro bruto (canaletas 2, 3, 6 e 7) e IgG purificada (canaletas 4 e 8) foram reagidos com as membranas, sendo as diluições 1:1000 (canaletas 2 e 6), 1:500 (canaletas 3 e 7) e 1:100 (IgG purificada, canaletas 4 e 8) empregadas. Como controle negativo foi utilizado soro não imune de coelho (canaletas 1 e 5, 1:1000). Pode ser observado que o anticorpo anti-peptídeo reconhece fortemente o antígeno de 92 kDa presente em ambos os tecidos, contudo sua expressão é reduzida no cérebro adulto e altamente expressa em animais com 6 dias de desenvolvimento pós-natal – P6 (comparar canaletas 2 - 4 com 6 - 8).

Para melhor investigar a expressão diferencial da proteína ADAM23 no desenvolvimento do SNC, procurou-se obter amostras protéicas de cérebros de embriões de camundongos no estágio E16 a partir da preparação de membrana deste órgão. Entretanto devido ao baixo rendimento destas preparações, consequência direta do tamanho diminuto dos cérebros dos embriões e das sucessivas etapas na obtenção das frações de membrana, não foi possível utilizar a abordagem de “Western Blotting” na preparação de membrana de cérebro de E16. Como são empregadas quantidades relativamente altas da preparação de membrana por canaleta de gel (tipicamente 600

μg) foi necessário concentrar estas preparações. A primeira tentativa foi a concentração direta da preparação por evaporação do solvente empregando um liofilizador (Speed Vac – Eppendorf AG). Tal procedimento quando executado a uma taxa de concentração de 10 vezes, elevou a concentração de sacarose de 0,32M para 3,2M, inviabilizando sua utilização em SDS-PAGE. Assim, procurou-se dialisar a preparação contra água deionizada para depois proceder à etapa de concentração. Tal procedimento levou a formação de um material agregado e insolúvel de difícil resolubilização em tampão de amostra para SDS-PAGE, o que inviabilizou sua utilização. Desta forma, buscou-se obter amostras protéicas do sistema nervoso central de embriões E16 pelo método de precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado, empregando cérebro e cerebelo como material de partida. Além disso, as mesmas estruturas nervosas de animais recém-natos e adultos, foram obtidas com o objetivo de evidenciar a expressão temporal de ADAM23 nestes estágios de desenvolvimento neural.

Baseado no resultado anteriormente obtido (figuras 2 e 3) de enriquecimento da proteína ADAM23 na fração 25% de saturação de sulfato de amônio, empregou-se a mesma abordagem na obtenção de frações 25% de saturação sobre os homogeneizados combinados de cérebro e cerebelo de animais E16, P6 e adultos.

A figura 5 mostra que camundongos E16 expressam acentuadamente ADAM23 quando comparado com animais adultos e recém-natos (P6). Estes dados, sugerem que a proteína ADAM23 esteja relacionada com o desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que esta desintegrina está sendo mais expressa em animais com sistema nervoso ainda imaturo.

Interessantemente a presença de bandas de maior e menor massa molecular, próximas a banda de 97kDa, e evidenciadas pelo anticorpo anti-ADAM23 sugere a expressão de isoformas desta molécula no sistema nervoso central.

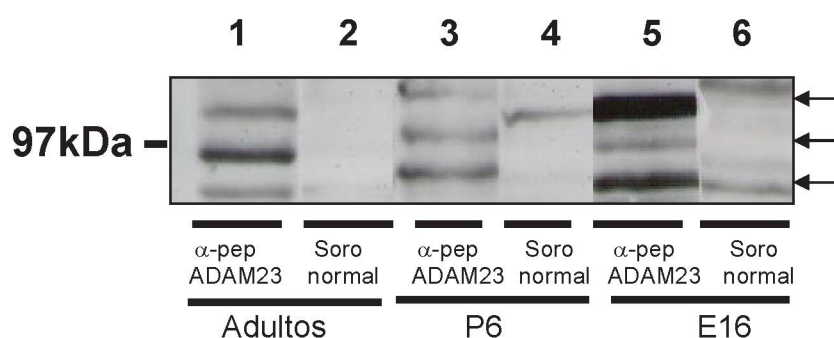


FIGURA 5: ADAM23 é diferencialmente expressa durante o desenvolvimento do sistema nervoso de camundongos. Proteínas resultantes da fração 25% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de amostras combinadas cérebro e cerebelo de camundongos adultos (canaletas 1 e 2), recém-natos (canaletas 3-4) e de embriões de 16 dias (canaletas 5-6) foram resolvidas ($100\mu\text{g}$ / canaleta) por SDS-PAGE 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida à reação de Western Blotting. Soro bruto anti-peptídeo ADAM23 (canaletas 1, 3 e 5) foi incubado com a membrana na diluição de 1:500. Como controle negativo foi utilizado soro não imune de coelho (canaletas 2, 4 e 6). Pode ser observada uma expressão aumentada de ADAM23 nas amostras de E16 quando comparada àquela apresentada nas amostras de recém-natos e adultos. A presença de mais de uma banda especificamente reconhecida pelo anticorpo anti-ADAM23 sugere a expressão de isoformas desta molécula no sistema nervoso central.

Na tentativa de melhor caracterizar bioquimicamente em qual região do SNC a expressão de ADAM23 estava aumentada foram utilizadas frações 25% de saturação obtidas separadamente do cérebro e cerebelo, tanto de animais P6 como de adultos. Na figura 06 é apresentada a reação do anti-ADAM23 com as amostras de cerebelo de animais adultos (canaleta 1) e P6 (canaleta 3). Nestas condições experimentais

aparentemente há uma maior expressão das isoformas de ADAM23 no cerebello de animais P6 do que em animais adultos.

Quando a região do SNC analisada é o cérebro (figura 07) há uma inversão da expressão, ou seja, foi possível observar que maior quantidade da proteína está presente nos animais adultos (canaleta 2) do que nos animais P6 (canaleta 4).

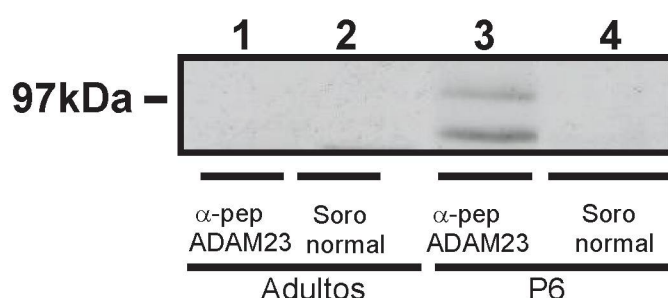


FIGURA 6: ADAM23 é diferencialmente expressa no cerebello de recém-natos (P6). Proteínas resultantes da precipitação de amostras de cerebello de camundongos adultos (canaletas 1-2) e recém-natos (canaletas 3-4) foram resolvidas (100µg/canaleta) eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida à reação de Western Blotting. Soro bruto antipeptídeo ADAM23 humana (canaletas 1 e 3) foi incubado com a membrana na diluição de 1:500. Como controle negativo foi utilizado soro não imune de coelho (canaletas 2 e 4). Pode ser observado que a expressão diferencial da ADAM23 ocorre em amostras oriundas de animais com 6 dias de nascimento, sendo a presença de bandas com menor intensidade em amostras de camundongos adultos. A reação antígeno-anticorpo foi evidenciada com anticorpo anti-Ig de coelho acoplado à peroxidase e reação quimioluminescente. As bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-ADAM23 são específicas uma vez que nenhuma banda é observada nos controles negativos (canaletas 2 e 4).

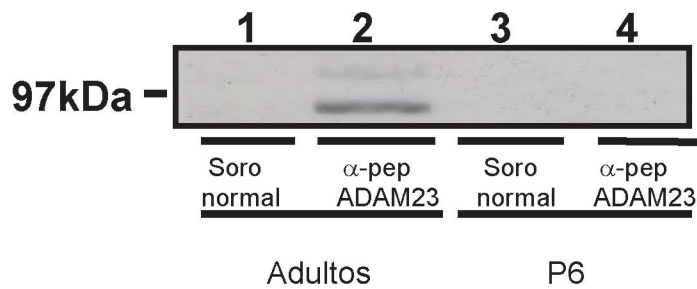


FIGURA 7: ADAM23 é diferencialmente expressa no cérebro de animais adultos. Proteínas resultantes da precipitação de amostras de cérebro de camundongos adultos (canaletas 1 e 2), recém-natos (canaletas 3 e 4) foram resolvidas (100µg/ canaleta) eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 6%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida à reação de Western Blotting. Soro bruto anti-peptídeo ADAM23 humana (canaletas 2 e 4) foi incubado com a membrana na diluição de 1:500. Como controle negativo foi utilizado soro não imune de coelho (canaletas 1 e 3). A reação antígeno-anticorpo foi evidenciada com anticorpos anti-Ig de coelho acoplados a peroxidase e reação quimioluminescente. Pode ser observado que a expressão diferencial da ADAM23 ocorre em amostras oriundas de animais adultos, sendo a presença de bandas com menor intensidade em amostras de recém-natos. A ausência de bandas nos controles negativos (canaletas 1 e 3) evidencia a especificidade da reação.

Em resumo, pode-se obter frações enriquecidas da proteína ADAM23 com precipitações sequenciais contendo sulfato de amônio a 25% de saturação. Utilizando esta abordagem foi possível verificar que esta proteína está mais expressa no sistema nervoso de animais em desenvolvimento do que em animais adultos.

Interessantemente ADAM23 possui expressão acentuada no cerebelo de animais recém-natos, entretanto havendo um deslocamento de expressão para o cérebro, com o concomitante amadurecimento do sistema nervoso.

Após o esforço de vários membros do laboratório foi possível obter um fragmento da molécula ADAM23 expresso em sistema heterólogo de *E. coli* (S.M.Zanata et al., dados não publicados).

Esta proteína possui os domínios metaloprotease e desintegrina e uma etiqueta de seis histidinas fundidas à porção amino-terminal do fragmento de ADAM23. Depois de purificada dos corpos de inclusão de bactérias *E. coli* transformadas com o vetor de interesse por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, a proteína recombinante possui mobilidade eletroforética aparente de 60kDa.

Quando esta proteína foi utilizada como antígeno em ensaio de “Western Blotting” com o anti-ADAM23pep (figura 8), foi possível evidenciar de modo inequívoco que este anticorpo se liga especificamente ao epítipo de camundongo. Este resultado reforça a capacidade do anti-ADAM23pep no reconhecimento da ADAM23 de camundongo, tanto expresso em sistema recombinante de *E. coli* como endogenamente pelo sistema nervoso central de murinos.

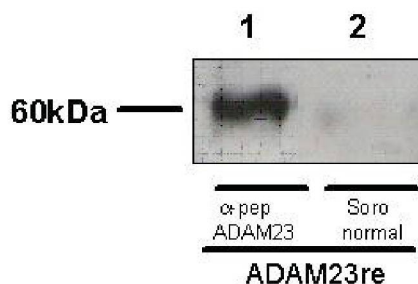


FIGURA 8: Anticorpo antipeptídeo ADAM23 humana reage especificamente com ADAM23 expressa em sistema recombinante de *E. coli*. Amostras contendo ADAM23 recombinante purificada (apresentando domínio desintegrina e metaloprotease) foram resolvidas (5μg/ canaleta) eletroforeticamente em gel de poliacrilamida a 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta submetida à reação de Western Blotting. Soro bruto antipeptídeo (canaleta 1) foi incubado com a membrana na diluição de 1:500. Como controle negativo foi utilizado soro não imune de coelho (canaleta 2) na mesma diluição. Foi possível observar que este anticorpo é capaz de reconhecer o antígeno produzido (ADAM23 recombinante) na altura de 60kDa, massa correspondente ao antígeno recombinante. Este ensaio mostra que o anticorpo utilizado reage de modo inequívoco com ADAM23 de camundongo e confere especificidade, no que diz respeito ao reconhecimento de ADAM23 no sistema nervoso de camundongos.

5.2 Ensaios Imunohistoquímicos

Sabendo-se que o anticorpo anti-ADAM23pep reconhece especificamente por ensaio de “Western Blotting” a proteína ADAM23 de camundongo (figuras 1 e 8) e, que adicionalmente esta proteína é fortemente expressa no cerebelo de camundongos recém-natos (P6) (figura 6) e em embriões de 16 dias de gestação, procurou-se avaliar a expressão temporal e espacial desta proteína nos estágios embrionários (E12, E14 e E16) e em cérebros adultos, através de ensaios imunohistoquímicos. Desta forma, embriões coletados de útero grávidico de camundongas e cérebros de animais adultos (mais de 3 meses pós-nascimento) foram processados conforme descrito no item 4.10.

Foram feitas colorações com material processado, anteriormente aos ensaios imunohistoquímicos com a finalidade de avaliá-lo estruturalmente. Assim, na figura 09 pode ser observado integridade tecidual nas três camadas celulares que constituem a substância cinzenta do cerebelo de camundongo adulto após o material ser corado com HE (Hematoxilina e Eosina). Os tipos celulares são perfeitamente distinguidos, verificando-se da periferia do órgão para a porção medular, a camada molecular (2), células de Purkinje (P) e camada granular (CG). A figura 10 evidencia alguns tipos celulares do sistema nervoso central de camundongos Swiss. Identificam-se morfológicamente bem definidos nesta figura, neurônios piramidais corticais (cabeça de seta) e células gliais (setas). Já a figura 11 evidencia região tecidual pertencente a focos cartilagosos (setas) de embrião E14, onde condrócitos apresentam-se bem definidos. Estas células cartilaginosas definem nestes focos posterior formação da coluna vertebral, pela sua substituição em células ósseas.

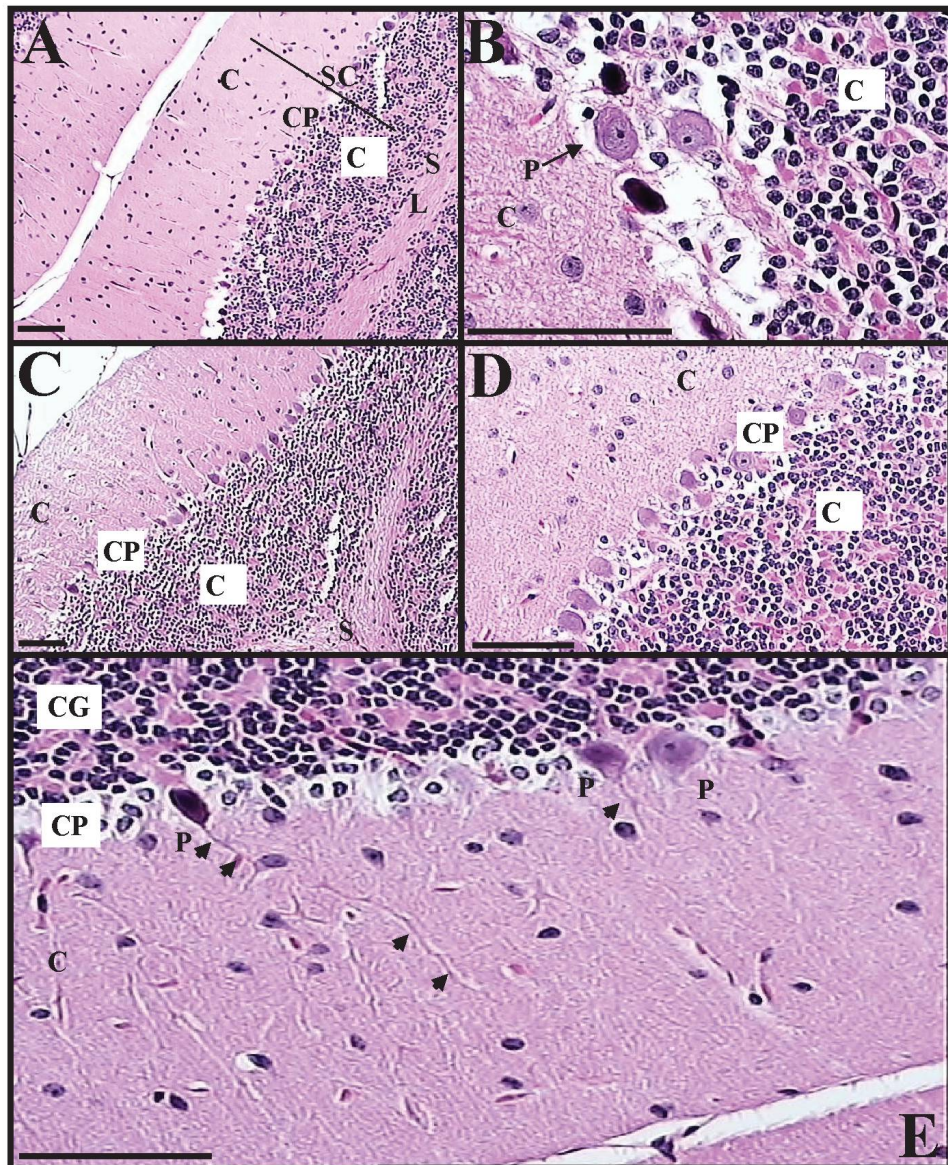


FIGURA 09: Cerebelo em cortes transversais evidenciando sua organização anatômica. São mostradas nesta figura diferentes tomadas fotográficas das três camadas celulares que compõem as substâncias cinzenta (SC - porção periférica do órgão) e a branca (SB - porção interna) do cerebelo. No Painel A e C pode-se distinguir a superfície do cerebelo, que é formada por uma camada de substância cinzenta com cerca de 1 mm de espessura, o córtex cerebelar. A substância branca divide-se em folhas medulares delgadas chamadas de lâminas medulares (LM) e contém as fibras nervosas dos precursores cerebelares dotados de mielina. No córtex do cerebelo distinguem-se uma camada externa corada de violeta claro, a camada molecular (*stratum moleculare* - CM) e uma camada interna violeta escuro, a camada granulosa (*stratum granulosum* - CG). Entre a CM e CG situa-se a camada de células de Purkinje (CP). No painel E é possível observar a disposição característica das células de Purkinje (P) na forma de fileiras localizadas no *stratum neuronarum piriformium* do córtex cerebelar. Dos corpos celulares piriformes de 50-70 μ de altura (P), em oposição à CM, sai um axônio geralmente sem pigmento e em oposição à CG saem dois, mais raramente três, dendritos que se ramificam (cabeça de seta). Eles formam, até a superfície cerebelar, uma ramagem densa, assemelhando-se a ramos de árvore (árvores dendríticas), cujo plano situa-se perpendicularmente à direção longitudinal das circunvoluções do cerebelo. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 100 vezes (A e C), 200 vezes (D) e 400 vezes (B e E) (B). Barra equiva- le a 100 μ m.

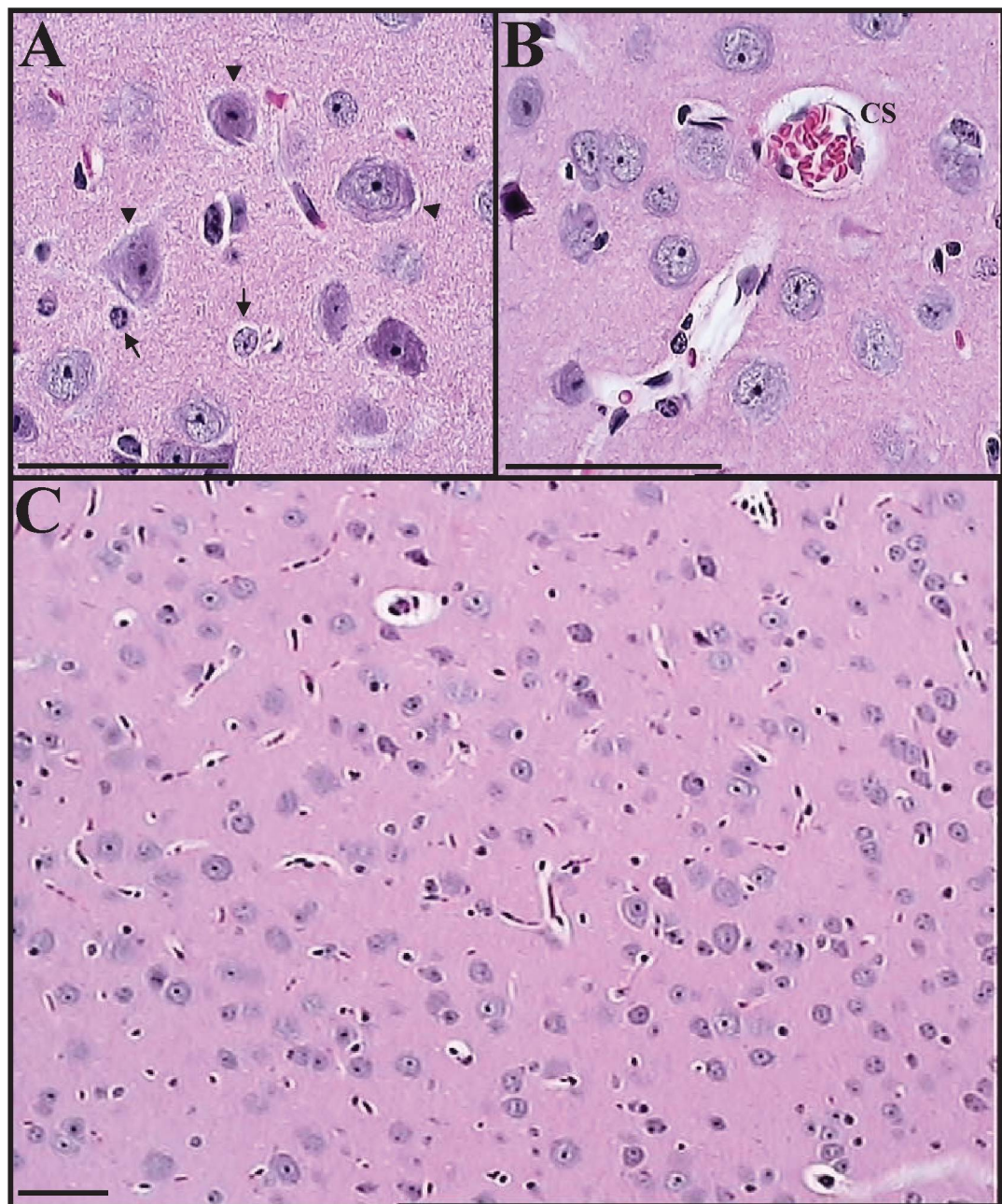


FIGURA 10: Cérebro de camundongos adultos em cortes transversais seriados evidenciando sua organização celular. São mostradas nesta figura, células nervosas de cérebros de camundongos Swiss. No painel A são apresentados neurônios piramidais corticais (cabeça de seta) e células da glia (seta). Em B pode ser observado parte da vasculatura cerebral representada por capilar sangüíneo (CS) contendo hemácias. Tal apresentação evidencia integridade do tecido após ter sido processado histologicamente. Aumento de 100 vezes (C) e 400 vezes (A e B). Barras equivalem a 100 μ m.

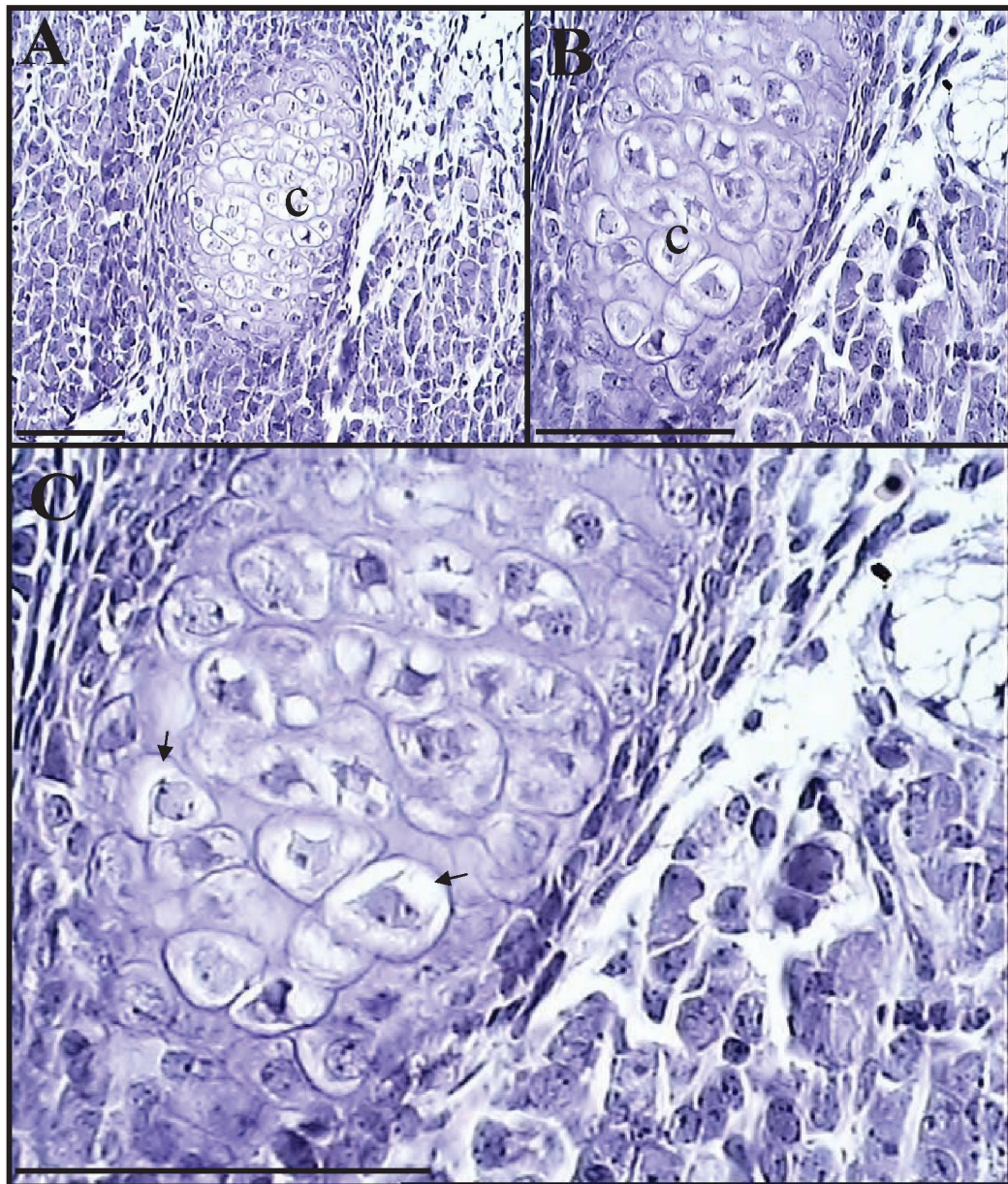


FIGURA 11: Condrócitos hipertróficos presentes em focos de cartilagem hialina em embriões de camundongo Swiss no estágio E14. Embriões E14 em cortes sagitais seriados foram submetidos a coloração histoquímica com corante básico Hematoxilina e ácido Eosina. Este procedimento teve como finalidade verificar a integridade tecidual após o material ser processado histologicamente, uma vez que tecido embrionário é frágil e muito sujeito a artefatos. Verificou-se com auxílio de microscopia de luz componentes teciduais morfológicamente bem definidos. Nestes focos cartilagosos (c), os condrocitos apresentam morfologia celular específica e volumosa (setas), por sua posterior substituição em células ósseas. Aumento de 200 vezes (A) e 400 vezes (B e C). Barras correspondem a 100µm.

As figuras 12, 13 e 14 mostram expressão intensa da proteína ADAM23 em regiões cerebrais de embriões E12 (figura 12A, C e E), E14 (figura 13A) e E16 (figura 14A, C e E), após incubação com soro bruto na diluição 1:100. Ausência de reatividade é evidenciada no controle negativo com aplicação de soro não imune de coelho (E12 figura 12B/ 12D, E14 figura 13B e E16 figura 14B, D e F). Desta forma mostrou-se evidente a expressão da proteína ADAM23 em regiões cerebrais distintas, como plexo coróide (região de futura organização e maturação do cerebelo) e em regiões da medula espinhal. Contudo, não se verificou diferença de intensidade de expressão do antígeno ADAM23 nos diferentes estágios embrionários E12, E14 e E16 através desta técnica imunohistoquímica nas mesmas condições experimentais.

Já a figura 15A mostra que tecido cartilaginoso não relacionado ao sistema nervoso apresenta ausência de positividade para o antígeno. Portanto, outros tecidos avaliados tais como músculo esquelético, adiposo, conjuntivo (dados não mostrados) também não apresentaram o antígeno nas condições experimentais empregadas. O respectivo controle negativo (figura 15B e C – soro não imune) continuou não apresentando nenhuma marcação nas mesmas condições da figura 15A.

Com base nos dados obtidos em reações de “Western Blotting”, avaliou-se também com ensaios imunohistoquímicos a expressão de ADAM23 no cérebro e cerebelo de animais Swiss adultos. A figura 16B mostra curiosamente que a expressão desta proteína no sistema nervoso já desenvolvido ou maturo (cérebro) pode estar acentuadamente diminuída uma vez que a reação positiva foi praticamente ausente (figura 16B) quando comparada ao controle negativo (figuras 16A e C).

A figura 17 (A, C e E) mostra reação positiva de ADAM23 no cerebelo de animais adultos quando o material foi tratado com anti-ADAM23pep e ausência de reatividade nos respectivos controles negativos (figura 17B, D e F). Este resultado pode ser correlacionado com a expressão desta molécula no desenvolvimento e maturação deste órgão ao se verificar expressão de ADAM23 em estruturas definidas do sistema nervoso central ainda imaturo (figura 14A, C e E), que irão formar o cerebelo.

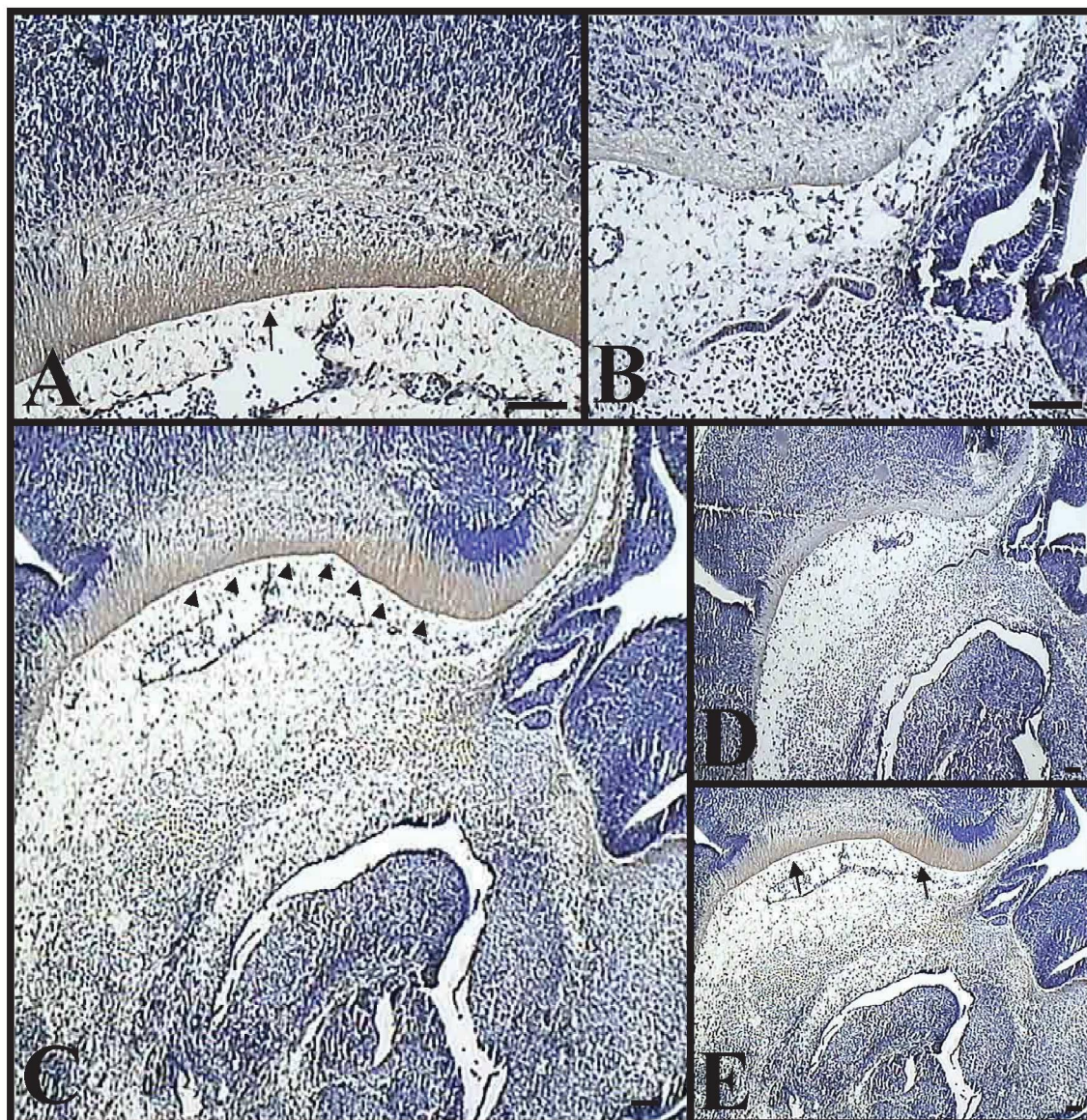


FIGURA 12: Expressão de ADAM23 no sistema nervoso de embriões E12. Embriões E12 em cortes sagitais seriados foram tratados com anticorpo anti-ADAM23pep humana na diluição 1:100 (A, C e E) e soro não imune de coelho (B e D) na mesma diluição. Posteriormente, os cortes foram tratados com anticorpo anti-IgG de coelho (1:100) conjugado com peroxidase, revelados com DAB e contra corados com Hematoxilina. Verificou-se expressão acentuada de ADAM23 na medula espinhal (setas e cabeças de seta) neste estágio embrionário. Contra coloração com HE. Aumento de 40 vezes (D e E) e 100 vezes (A, B e C). Barras = 100 μ m.

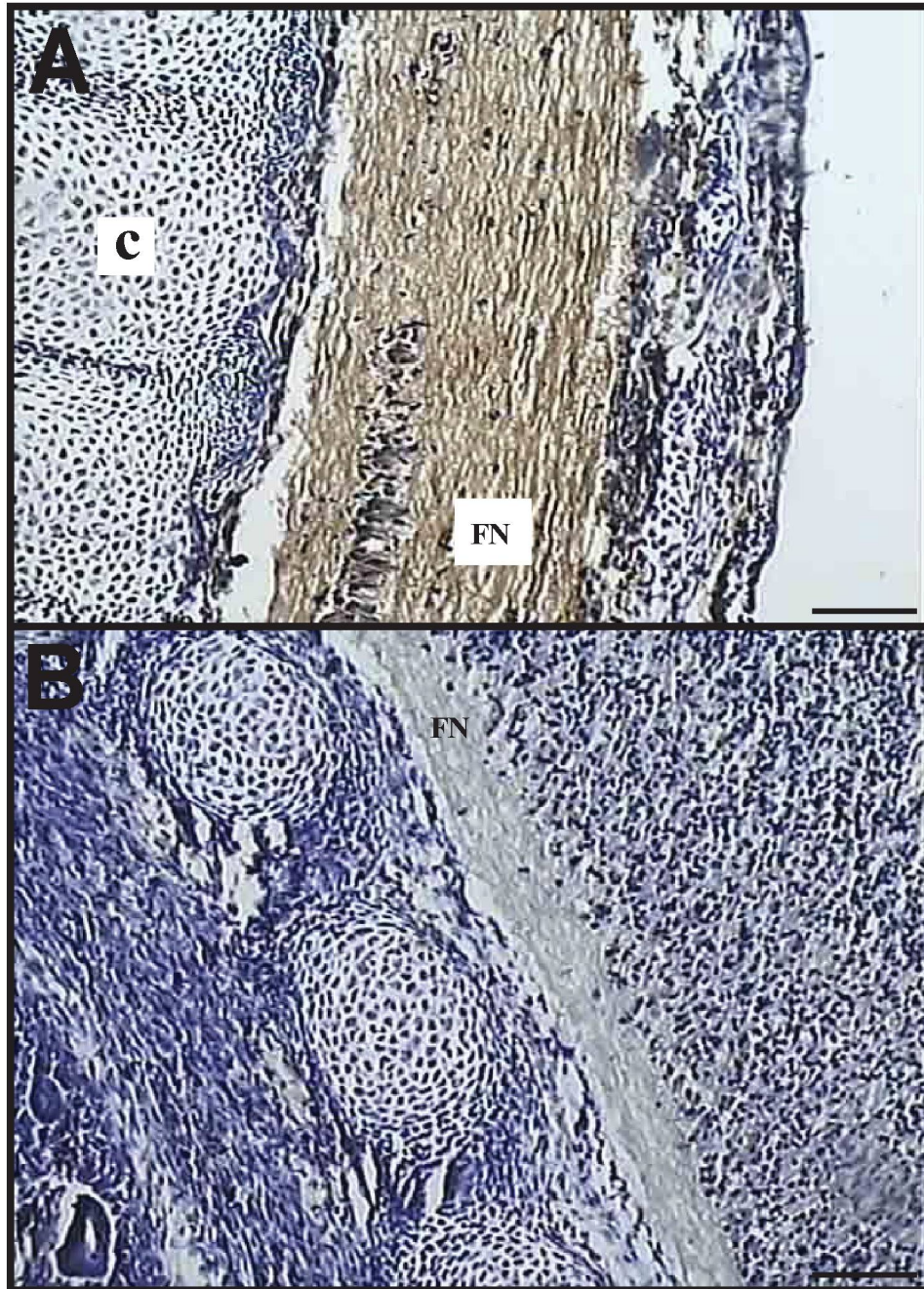


FIGURA 13: Expressão de ADAM23 no sistema nervoso de embriões E14. Embriões E14 em cortes sagitais seriados foram tratados com anticorpo anti-ADAM23pep humana na diluição 1:100 (A) e soro não imune de coelho (B) na mesma diluição. Estes cortes foram em seguida incubados com anticorpo anti-IgG de coelho (1:100) conjugado com peroxidase, revelados com DAB e contra corados com Hematoxilina. Verificou-se intensa marcação nas fibras nervosas (FN) da medula espinhal (painel A) nestes embriões, o que sugere um papel desta molécula na formação ou manutenção desta estrutura tecidual no sistema nervoso. No painel A fica evidente que a expressão de ADAM23 está restrita ao tecido nervoso uma vez que ausência de reatividade foi observada no tecido cartilaginoso adjacente (letra c). Aumento de 100 vezes. Barras = 100 μ m.

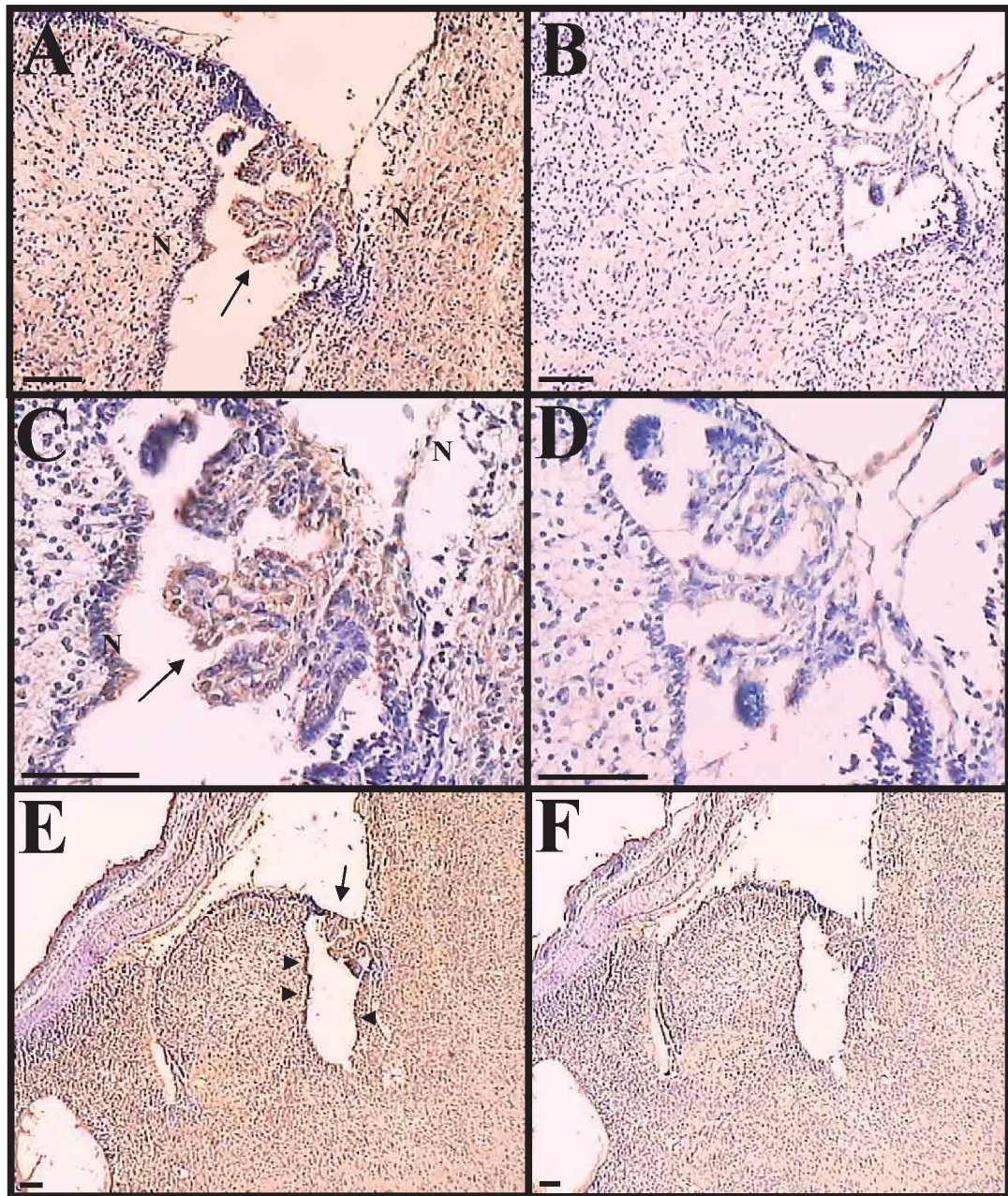


FIGURA 14: Expressão de ADAM23 no sistema nervoso de embriões E16. Cortes sagitais seriados de embriões E16 foram tratados com anti-ADAM23pep humana na diluição 1:100 (A, C e E) e soro não imune de coelho (B, D e F – controle negativo) na mesma diluição. A reação foi prosseguida com o tratamento dos cortes com anticorpo anti-IgG de coelho (1:100) conjugado com peroxidase e revelação com DAB seguida de contra coloração com Hematoxilina. Verificou-se a expressão de ADAM23 em regiões específicas do sistema nervoso em desenvolvimento, em particular no plexo coróide (seta) e no neuroepitélio adjacente a formação cerebelar (NP e cabeças de seta). Aumento de 100 vezes (A e B), 200 vezes (C e D) e 40 vezes (E e F). Barra = 100 μ m.

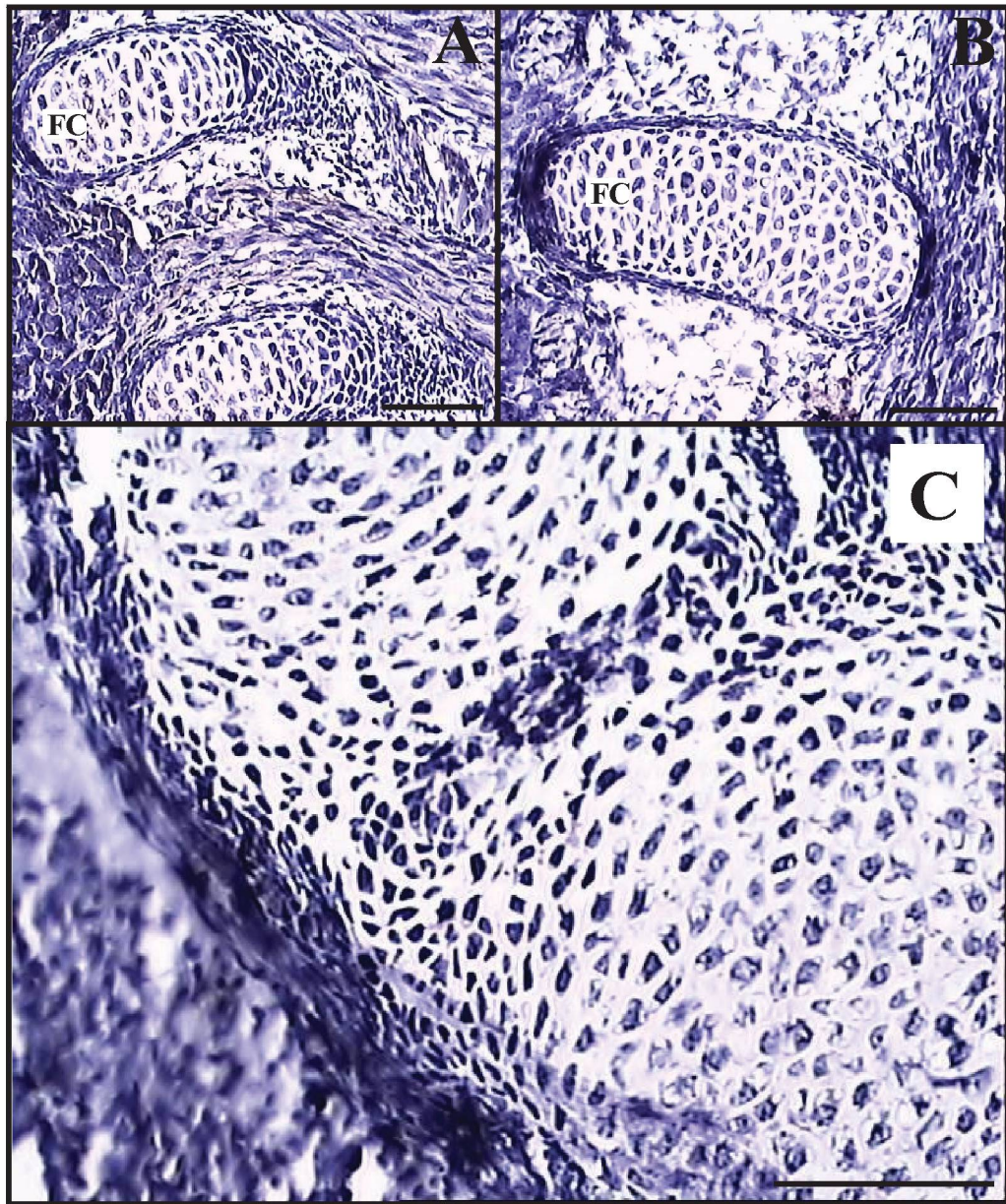


FIGURA 15: Ausência de expressão de ADAM23 em focos cartilagosos presentes em embriões E14. Embriões E14 em cortes sagitais seriados foram tratados com anticorpo anti-ADAM23pep humana na diluição 1:100 (A) e soro não imune de coelho (B e C) na mesma diluição. Foi verificada a ausência de expressão desta molécula nos focos cartilagosos (FC) neste estágio embrionário, o que sugere que ADAM23 está presente quase que exclusivamente em tecidos de origem neural. Aumento de 200 vezes. Barras = 100 μ m.

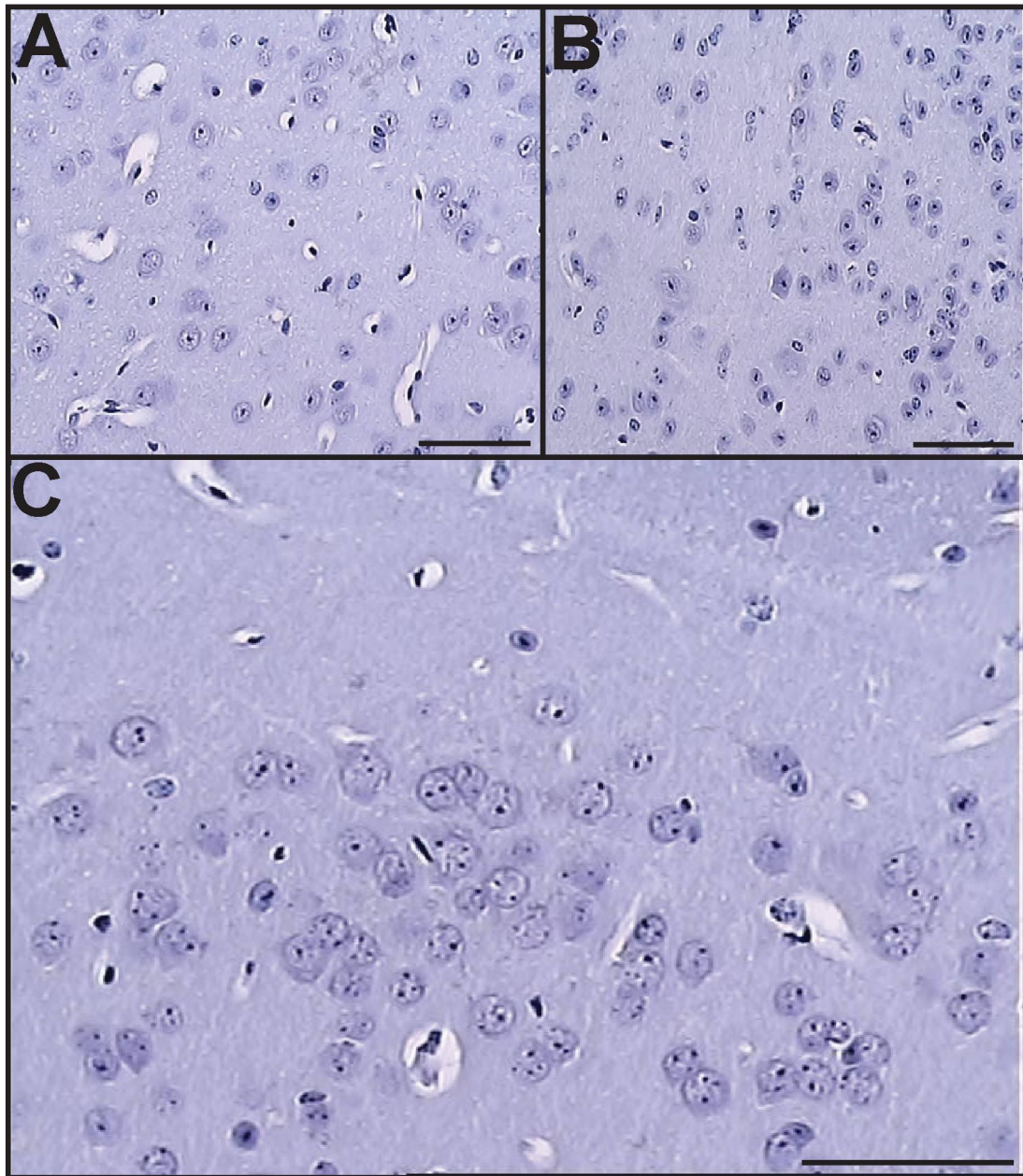


FIGURA 16: Expressão de ADAM23 no cérebro de camundongos Swiss adultos. Cérebro de animais adultos em cortes transversais seriados foram tratados com anti-ADAM23pep humana na diluição 1:100 (B) e soro não imune de coelho (A e C) na mesma diluição. Foi possível verificar uma leve marcação positiva na figura B, sugerindo expressão diminuída do antígeno neste tecido quando comparada àquela observada no cerebelo de animais adultos (figura 17). Aumento de 200 vezes. Barras = 100 μ m.

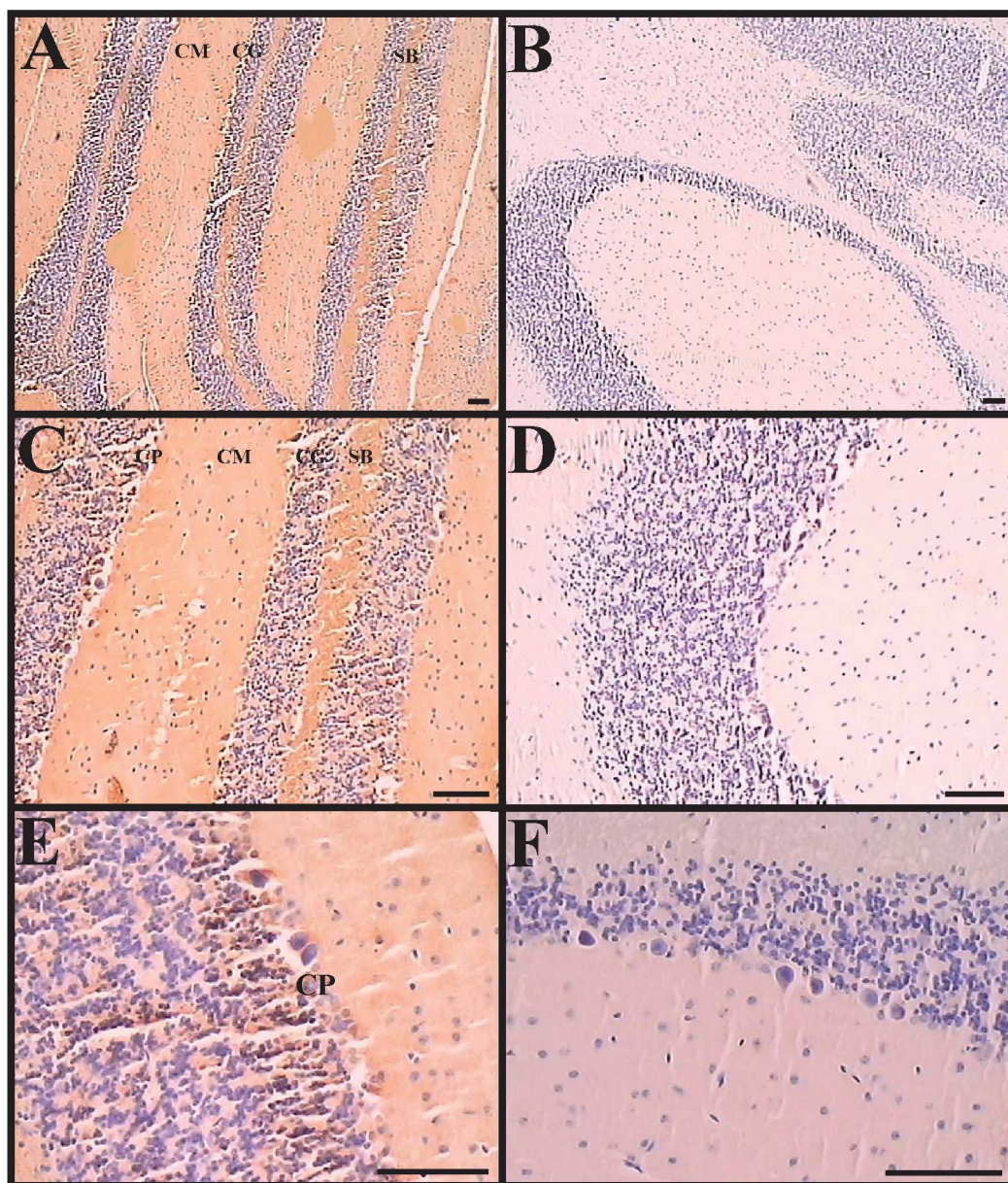


FIGURA 17: Expressão de ADAM23 no cerebelo de animais adultos. Cerebelo de camundongos Swiss adultos em cortes transversais seriados foram tratados com anticorpo anti-ADAM23pep humana na diluição 1:100 (A, C e E) e soro não imune de coelho (B, D e F) na mesma diluição. Verificou-se expressão de ADAM23 em toda a extensão deste órgão (painel A), entretanto aparentemente há um enriquecimento do antígeno na substância branca (painel C) e nas células de Purkinje (painel E). Ausência de reatividade com soro não imune de coelho confirma especificidade do anticorpo empregado (painéis B, D e F). Camada molecular (CM), camada de Purkinje (CP), camada granular (CG) e substância branca (SB). Aumento de 40 vezes (A e B), 100 vezes (C e D) e 200 vezes (E e F). Barras = 100μm.

5.3 Ensaio de adesão

Na tentativa de elucidar qual seria a função biológica da proteína ADAM23, procurou-se inicialmente avaliar a participação desta molécula em eventos da adesão celular, uma vez que ADAM23 pode interagir tanto com receptores da matriz extracelular (e.g. $\alpha_v\beta_3$) como seus componentes (e.g. vitronectina) de forma independente ao tripeptídeo RGD (CAL et al., 2000). Assim empregou-se a linhagem de glioblastoma humano A172, a qual expressa ADAM23 de forma acentuada (COSTA et al., 2005).

Células em cultura foram desafiadas com anticorpos anti-ADAM23pep ou IgG irrelevante de coelho e semeadas sobre fibronectina (figura 18A, B, C e D) e vitronectina (figura 19A, B, C e D). Neste tipo de ensaio, os anticorpos específicos devem se ligar aos antígenos expressos na superfície das células e assim bloquear a sua possível atividade biológica uma vez que o anticorpo impediria estericamente os processos moleculares da ADAM23.

O ensaio em si funcionou de forma adequada, pois a adesão das células A172 sobre fibronectina (figura 18) e vitronectina (figura 19) foi abundante, enquanto poucas células aderiram no substrato recoberto apenas com o agente bloqueante do plástico, albumina do soro bovino (figura 20). A ausência de adesão nesta condição experimental foi independente da presença de anti-ADAM23pep (figura 20A) ou IgG irrelevante de coelho (figura 20B). Desta forma, utilizando as condições experimentais descritas o anticorpo não foi capaz de interferir no processo de adesão desta linhagem sobre fibronectina e vitronectina.

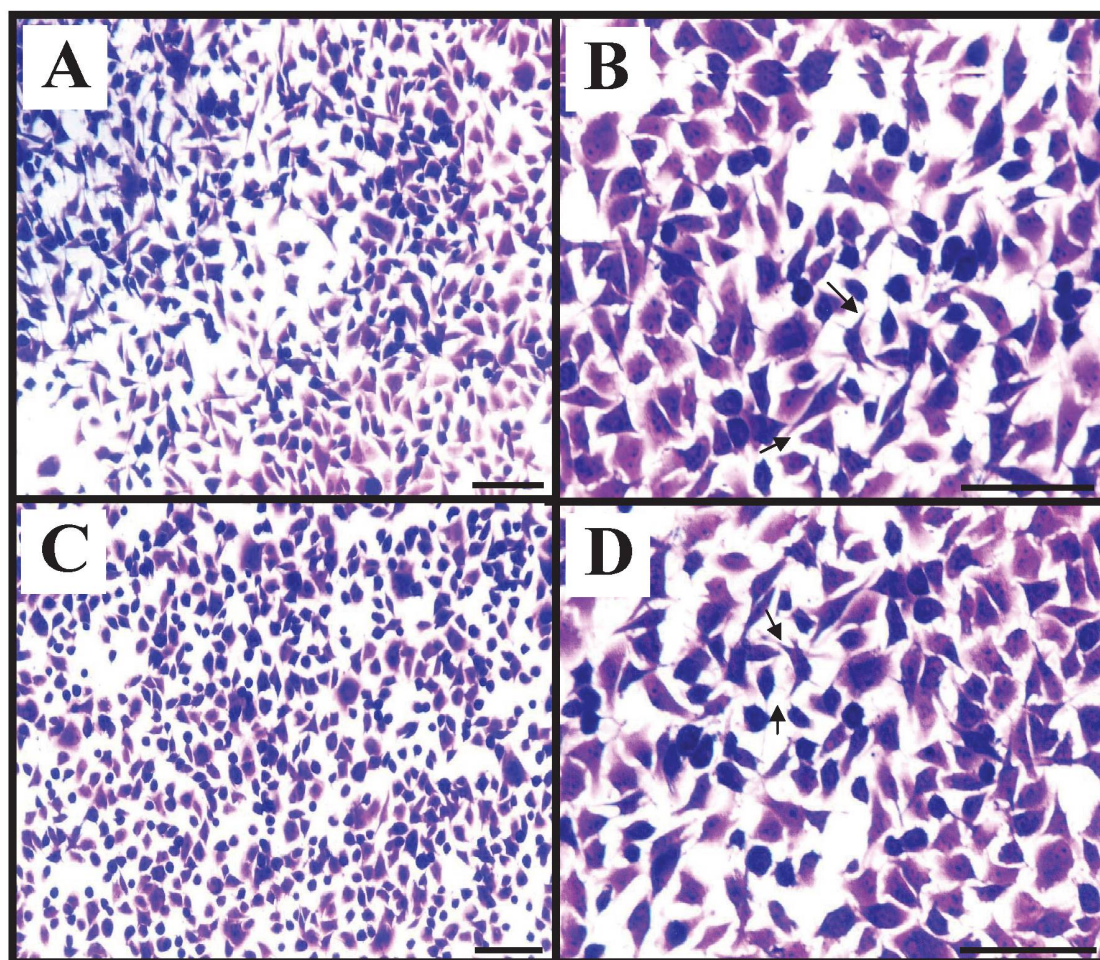


FIGURA 18: Adesão de células A172 semeadas sobre fibronectina. Células A172 foram pré-tratadas com IgG anti-ADAM23pep humana (A e B) na diluição 1:25 e semeadas sobre fibronectina. Após 1 hora as células aderidas foram fixadas, coradas com cristal violeta e tomadas fotográficas feitas com o auxílio de microscópio invertido. Nas situações C e D as células foram incubadas com IgG irrelevante de coelho no lugar do anti-ADAM23. Tanto o tratamento com o anticorpo específico como o respectivo controle negativo não apresentaram qualquer efeito sobre o fenômeno adesivo desta linhagem sobre fibronectina. As setas indicam formação de projeções de membrana plasmática evidenciando a competência desta linhagem em aderir sobre este substrato. Aumento de 100 vezes (A e C) e 200 vezes (B e D). Barras = 100 μ m.

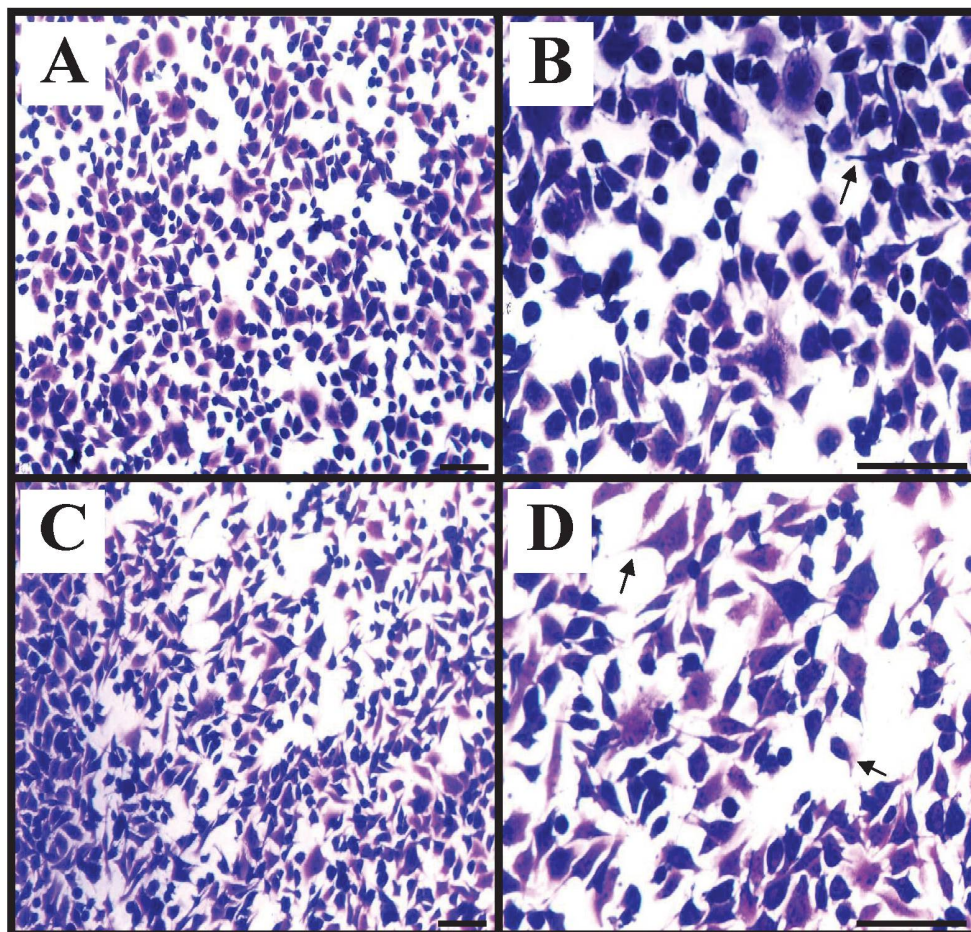


FIGURA 19: Adesão de células A172 semeadas sobre vitronectina. Células A172 em cultura foram pré-tratadas com IgG anti-ADAM23pep humana (1:25, painéis A e B) ou IgG irrelevante de coelho (painéis C e D) e semeadas sobre poços tratados com vitronectina. Células foram fixadas, coradas com cristal violeta e fotografadas com auxílio de microscópio invertido. Observa-se que adesão destas células sobre vitronectina não foi inibida em nenhuma das 2 situações. As setas indicam formação de projeções membranosas como consequência da adesão destas células sobre o substrato aplicado. Aumento de 100 vezes (A e C) e 200 vezes (B e D). Barras = 100 μ m.

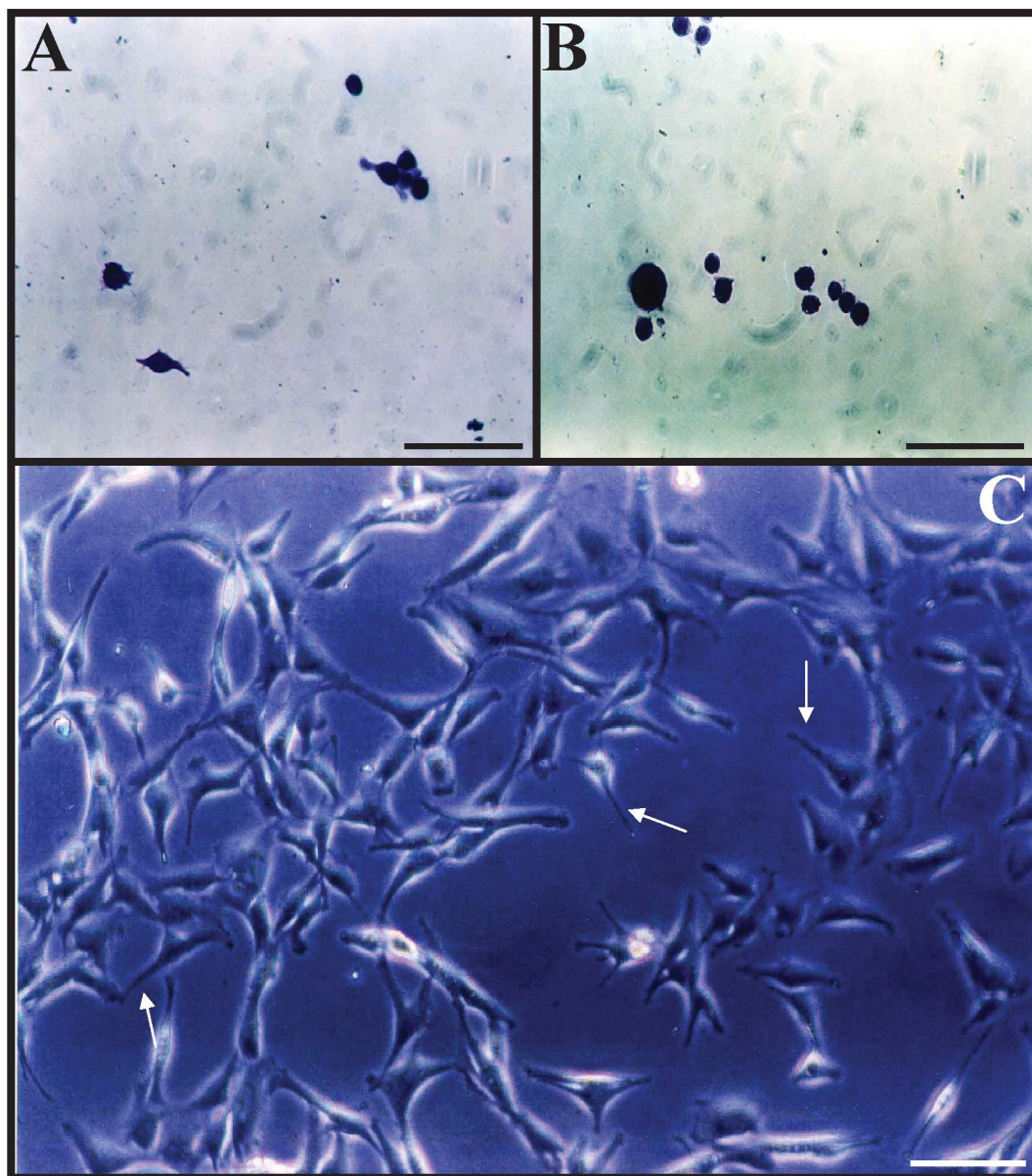


FIGURA 20: Ausência de adesão de células A172 semeadas em poços não tratados com moléculas de matriz extracelular. Células A172 em cultura foram incubadas com IgG anti-ADAM23pep humana (A) e IgG irrelevante de coelho (B) na diluição de 1:25 por 1 hora. Células foram fixadas e coradas com cristal violeta, além de serem fotografadas com auxílio de microscópio invertido. Observa-se que células A172 não se aderiram a placa de cultura em nenhuma das duas situações. Na figura C é mostrada a mesma linhagem sob condições padrão de cultivo, sendo evidenciada a formação de inúmeras projeções membranosas (setas). Aumento de 200 vezes (A e B) e 100 vezes (C). Barras = 100 μ m.

5.4 Ensaios de Imunofluorescência

Levando-se em conta os resultados obtidos nos ensaios de adesão, deveríamos avaliar a possibilidade do anticorpo não estar se ligando à ADAM23 expressa na superfície das células A172. Desta forma foram feitos ensaios de imunocitoquímica com marcação dos imunocomplexos com agentes fluorescentes e observação das células por microscopia confocal.

Como pode ser observado na figura 21, não foi identificada nenhuma marcação nas células A172 cultivadas sobre lamínulas de vidro e reagidas com anti-ADAM23pep (figura 21A) e soro não imune de coelho (figura 21B – controle negativo).

Como já havia sido demonstrado (COSTA et al., 2005) que tal linhagem expressa ADAM23, podemos concluir que o anti-ADAM23pep não possui a capacidade de reconhecer o antígeno de interesse na forma estrutural que é apresentada na superfície desta linhagem.

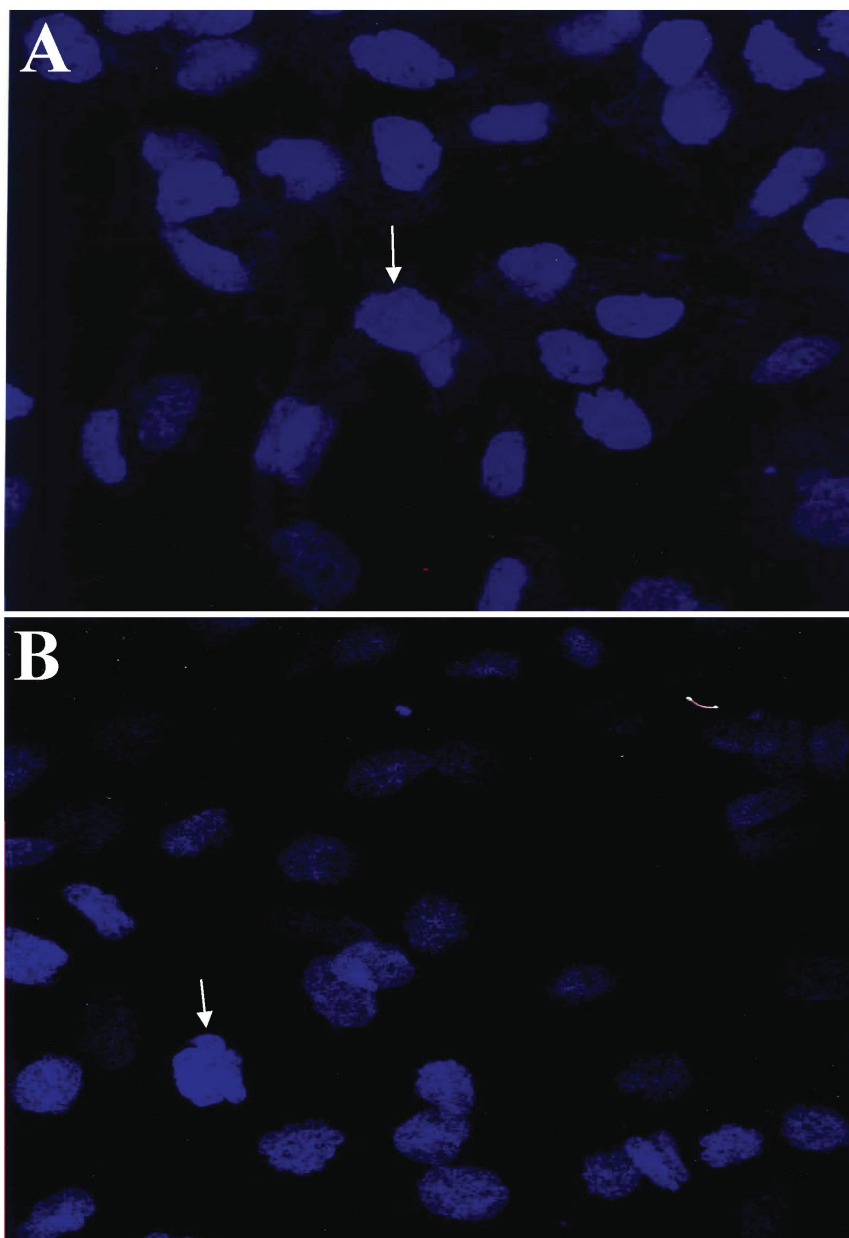


FIGURA 21: Anticorpo anti-ADAM23pep humana não reconhece a proteína ADAM23 na conformação estrutural apresentada na superfície celular (forma nativa). Células A172 foram incubadas com anti-ADAM23pep humana (A) e soro não imune de coelho (B) na diluição de 1:50. O núcleo das células foi marcado citoquimicamente com corante azul fluorescente DAPI. O padrão de fluorescência foi avaliado por microscopia confocal. Pode-se observar apenas marcação nuclear das células A172 nas duas situações (setas), o que sugere que este anticorpo não é capaz de reconhecer a proteína ADAM23 na sua forma nativa. Magnificância de 600x.

VI. DISCUSSÃO

Levando-se em conta os objetivos principais deste trabalho em avaliar a expressão temporal da proteína ADAM23 e caracterizar sua participação no processo de adesão celular é de fundamental importância avaliar se o anticorpo policlonal gerado contra a sequência da proteína ADAM23 humana reconhece o homólogo de camundongo.

Como pode ser observado na figura 01, o anticorpo anti-peptídeo reage de maneira específica com um antígeno na altura de 97kDa expresso no cérebro de camundongos adultos. Já a capacidade deste anticorpo em reconhecer a proteína ADAM23 humana expressa em linhagens originárias de tumores de mama (COSTA et al., 2004) e de células gliais (COSTA et al., 2005) foi recentemente demonstrado pelo nosso grupo.

Este anticorpo policlonal foi elicitado em coelhos a partir da utilização de um peptídeo quimicamente sintetizado e possuindo a sequência CNNTSCLFQPRGYECRDAVNECDIT que está inserida no domínio desintegrina da molécula humana. Comparando a sequência correspondente na proteína de camundongos (CNNTSCLFQSRGYECRDAVNSCDIT) obtida no “genebank” (accession n. AB009673 – ilustração 01 – em resultados) é possível concluir que a capacidade de reconhecimento deste anticorpo se deve à provável manutenção do epítopo reconhecido por ele. A troca de uma prolina por uma serina e um ácido glutâmico por outra serina provavelmente não deve ter produzido modificações estruturais importantes no epítopo, pelo menos no que tange o reconhecimento pelo anticorpo. Desta forma, a reação cruzada do anti-ADAM23pep com o antígeno expresso por

murinos viabiliza parcialmente a utilização deste anticorpo como ferramenta nos experimentos executados neste trabalho. A utilização de animais adultos como fonte de ADAM23 é legítima pois foi demonstrado recentemente sua expressão em animais adultos (GOLDSMITH et al., 2004) e recém-natos (MITCHELL et al., 2001).

Como são inexistentes protocolos padronizados para a obtenção de ADAM23 purificada procurou-se levar a cabo precipitações seqüenciais com solução de sulfato de amônio saturado com a intenção de se obter uma fração enriquecida desta proteína, uma vez que a utilização de homogeneizado bruto de cérebro mostrou-se inadequada pela baixa concentração relativa de ADAM23.

Utilizando esta abordagem foi possível observar que frações cerebrais obtidas por precipitação seqüencial com 25% de sulfato de amônio se apresentavam mais enriquecidas em ADAM23 quando esta fração foi comparada com outras diferentes frações (15%, 35%, 45% e 55%) obtidas pelo mesmo método (figura 02). Quando se compara a reação do anti-ADAM23pep (figura 3) com a mesma concentração de homogeneizado total de cérebro (canaleta 2) e a fração 25% (canaleta 4) pode-se constatar que realmente a precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi eficiente na purificação parcial ou obtenção de fração protéica enriquecida de ADAM23.

A purificação parcial de ADAM23 entre as frações menos concentradas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (25%) está de acordo com o previsto para proteínas de membrana. Como exemplo poderíamos destacar a proteína prion celular (PrPc) a qual está ancorada à membrana plasmática por motivo GPI e é parcialmente purificada na fração 30% de saturação (MARTINS et al., 1997) enquanto imunoglobulinas do isotipo G (IgG), presentes em grandes concentrações no plasma, ainda é encontrada solúvel no sobrenadante de precipitações contendo 60% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (HARLOW &

LANE, 1998). Em resumo, proteínas de membrana, com alto conteúdo hidrofóbico tendem a ser menos solúveis em menores concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que proteínas naturalmente solúveis no ambiente celular.

Baseando-se em dados da literatura (SUN et al., 2004), amostras enriquecidas em proteínas da membrana plasmática foram obtidas a partir da preparação de membrana de cérebros de camundongos, uma vez que a desintegrina ADAM23 é caracterizada como uma proteína presente neste compartimento celular. Após obtenção destas amostras foi possível observar que preparações de membrana estavam mais enriquecidas em ADAM23 do que homogeneizados totais obtidos através da dissociação do tecido com detergentes, tipicamente TRITON X-100 e NP-40 (dados não mostrados). Desta forma optou-se por utilizar preparação de membrana de cérebros como fonte de ADAM23 com o intuito de verificar expressão temporal deste antígeno no desenvolvimento do sistema nervoso.

Goldsmith e colaboradores (2004), enfatizam que a família ADAM compreende proteínas transmembrânicas tipo I, onde neste grupo são conhecidos mais de 30 membros e diversas destas moléculas estão envolvidas em uma série de processos biológicos que incluem diferenciação e fusão de mioblastos, fertilização, secreção de fatores de crescimento e determinação do destino de células de origem neural. Assim, os resultados obtidos com a purificação parcial de ADAM23 por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e as preparações de membrana de cérebro vão ao encontro destes dados da literatura.

Interessantemente foi encontrado um aumento na expressão de ADAM23 no cérebro de animais recém-natos quando comparada com animais adultos (figura 04).

Tal achado sugere que ADAM23 possa estar envolvida na maturação e desenvolvimento do sistema nervoso. Esta especulação já foi feita por outro grupo (CAL et al., 2002) baseado em dados de interação da ADAM23 com a integrina $\alpha_v\beta_3$. A interação da integrina $\alpha_v\beta_3$ com vitronectina, proteína da matriz extracelular e um dos seus ligantes, está envolvida com a formação do cerebelo uma vez que medeia a migração e diferenciação dos precursores granulares da camada granular externa para a camada granular interna (WECHSLER-REYA, 2001).

Assim especulou-se que ADAM23 poderia participar deste evento como modulador da interação $\alpha_v\beta_3$ -vitronectina, uma vez que ADAM23 pode interagir com esta integrina de forma independente do tripeptídeo RGD (CAL et al., 2000). Os resultados aqui apontam para uma expressão diferencial em animais com sistema nervoso imaturo e adulto, corroborando com as hipóteses descritas na literatura (CAL et al., 2000; GOLDSMITH et al., 2004).

Adicionalmente foram realizados ensaios de Western Blotting com amostras de preparações de membrana originárias de embriões de camundongos de 16 dias de gestação para análise comparativa com amostras de P6 e adultos. Infelizmente não foi possível executar a separação eletroforética destas amostras. Como o cérebro desses animais em desenvolvimento (E16) possui tamanho reduzido, quando comparados com os de adulto e recém-natos, obteve-se pouca massa de amostra, sendo portanto necessário concentrar este material em liofilizador. Ao final desta etapa de concentração protéica obteve-se amostras com alta viscosidade, resultado direto da alta concentração final de sacarose (ca, 3,2M), a qual inviabilizou a separação eletroforética.

Buscou-se, portanto, obter novas amostras protéicas do sistema nervoso de E16, P6 e animais adultos através do método de precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado. Com esta abordagem o material de partida não é a suspensão bruta de membranas obtidas da homogeneização do tecido com sacarose, mas um extrato de tecido onde as moléculas são dispersas com o auxílio de detergentes (Deoxicolato de sódio e Triton X-100). Deste último extrato são obtidas as frações de corte com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Após ter sido mostrado primeiramente, que ADAM23 precipita na fração 25% de sulfato de amônio saturado (figura 02), a partir desses dados, ensaios bioquímicos com amostras do sistema nervoso central de P6 e E16 foram prosseguidos.

Interessantemente, a figura 5 mostra diferenças marcantes de expressão da ADAM23 em amostras provenientes do sistema nervoso de embriões (E16), recém-natos (P6) e animais adultos. Detectou-se a expressão acentuada de ADAM23 em estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central, especialmente em E16, ao se analisar amostras combinadas de cérebro e cerebelo (fração 25%). Percebe-se ainda presença de diferentes bandas na altura de 97 kDa, reconhecidas pelo anti-ADAM23pep, sugerindo-se presença de isoformas da ADAM23 (ADAM23 α , β e γ) nestes diferentes estágios de desenvolvimento neural, validando-se com dados da literatura (SUN et al., 2004; NOVAK, 2004). Além do mais, dentro de uma mesma fase do desenvolvimento estas possíveis isoformas se apresentam expressas de maneira diferenciada.

Dados descritos por SUN e colaboradores (2004) sugerem a existência de transcritos diferencialmente processados (processamento alternativo de RNA), os quais

originariam as isoformas α , β e γ de ADAM23. ADAM23 α e ADAM23 β possuem mais similaridade entre si do que quando comparadas com ADAM23 γ . Esta última está presente em diferentes estágios de desenvolvimento do sistema nervoso, tanto no período embrionário quanto no neonatal. Adicionalmente, indica-se que a ADAM23 α não possui o domínio transmembrânico, e esta característica não impede esta molécula de competir com as outras duas isoformas pela ligação com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e assim mediar o desenvolvimento e manutenção das funções neurais (SEALS & COURTNEIDGE, 2003; SUN et al., 2004).

Conclusivamente, a este ensaio, percebe-se que ADAM23 é mais expressa em estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e em particular, em amostras de embriões (E16) de forma mais acentuada do que no cérebro de recém-natos (P6) e animais adultos, o que corroboram com dados da literatura em que ADAM23 pode estar envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso e na formação de extensões nervosas (neuritos). Contudo, quando consideradas as isoformas de ADAM23, propostas por SUN, a figura 5 evidencia que estas podem ser expressas diferencialmente no decorrer da evolução do desenvolvimento do sistema nervoso.

ADAM22, a qual é enzimaticamente inativa, neste contexto é requerida em mamíferos para promover mielinização de axônios no sistema nervoso periférico (NOVAK, 2004). Adicionalmente, camundongos deficientes no gene que codifica ADAM23, também inativa proteoliticamente, mostram inúmeros defeitos neurológicos com apenas uma semana após o nascimento e conseqüentemente morrem muito cedo (MITCHELL et al., 2001).

Estas descobertas sugerem que certos tipos de interações entre ADAMs e integrinas são essenciais para promover desenvolvimento e permitir funcionalidade ao sistema nervoso. O caso de ADAM23 é especialmente sugestivo neste aspecto, porque tem sido estabelecido que esta molécula age como ligante de integrina $\alpha_v\beta_3$ (CAL et al., 2000). Além do mais, integrinas $\alpha_v\beta_3$ são moléculas potenciais que agem estimulando a proliferação de precursores de oligodendrócitos em cérebros perinatais (BARON et al., 2002) e também parecem ser necessárias para a maturação de sinapses hipocampais excitatórias (CHAVIS & WESTBROOK, 2001). Desta forma, pela interação integrina $\alpha_v\beta_3$ e a desintegrina ADAM23 sugere-se que esta molécula está envolvida em processos biológicos essenciais como mielinização ou aquisição de memória. Potencialmente, o dramático fenótipo de camundongos que não expressam ADAM23 confirma que esta desintegrina é estabelecida primeiramente como chave biológica potencial no sistema nervoso (GOLDSMITH et al., 2004).

Baseando-se em dados da literatura que descrevem a expressão desta molécula no cerebelo (GOLDSMITH et al., 2004; SUN et al., 2004), procurou-se investigar a expressão diferencial de ADAM23 separadamente no cérebro e cerebelo de animais recém-natos (P6) e adultos a partir de novas amostras obtidas por precipitação seqüencial com sulfato de amônio saturado. A figura 06 evidencia maior intensidade de expressão de ADAM23 no cerebelo de recém-natos (P6) quando comparada com a expressão em animais adultos (comparar canaleta 1 com 3 da figura 06). Como a quantidade de antígeno utilizada neste experimento foi substancialmente menor (100 μ g) quando comparada aos anteriores (figura 4, 600 μ g) pode-se observar menor intensidade de marcação do antígeno em P6 e ausência de reatividade na amostra dos

animais adultos. Tal resultado isoladamente poderia conduzir a conclusão errônea de que não há expressão da ADAM23 em adultos, fato esse, não verdadeiro uma vez que tal presença é verificada em amostras (cérebro e cerebelo) mais concentradas (figura 4). Entretanto este resultado sugere uma maior expressão de ADAM23 no cerebelo de animais recém-natos do que em adultos.

A expressão aumentada de ADAM23 no cerebelo de animais recém-natos sugere uma possível função desta proteína durante o amadurecimento do sistema nervoso central. De fato foi recentemente descrita na literatura uma intensa expressão de ADAM23 no cerebelo de animais P5. Nesta fase do desenvolvimento a camada granular interna possui uma expressão acentuada de ADAM23 enquanto a camada granular externa possui menor expressão. Uma aparente ausência de reatividade foi observada na substância branca do cerebelo (GOLDSMITH et al., 2004). Interessantemente é nesta fase do desenvolvimento que as células granulares cerebelares migram da camada granular externa para a interna através das fibras gliais das células de Bergmann (CEPKO et al., 1997). Estes dados sugerem um possível envolvimento da ADAM23 no processo de migração e diferenciação das células granulares do cerebelo.

Curiosamente a expressão da ADAM23 no cérebro é inversa ao achado do cerebelo. Na figura 07 foi possível mostrar que ADAM23 no cérebro é mais expressa em animais com sistema nervoso mais desenvolvido do que aqueles com sistema nervoso ainda imaturo. Em resumo, quando se compara o cerebelo com o cérebro, animais recém-natos expressam no cerebelo um nível mais acentuado de ADAM23, sendo que animais adultos a expressam em maior quantidade no cérebro. Estes dados

mostram pela primeira vez que esta molécula é expressa diferencialmente durante o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso.

Transcritos de ADAM23 expressos primeiramente ou exclusivamente por neurônios em diferentes regiões do sistema nervoso central (SUN et al., 2004; GOLDSMITH et al., 2004), levam a síntese de duas formas glicosiladas (ADAM23^{70kDa} e ADAM23^{100kDa}) as quais parecem estar presentes predominantemente na superfície celular mediando associações intercelulares (GOLDSMITH et al., 2004).

Marcadamente ADAM23 é amplamente expressa no cérebro de camundongos e pode ser detectada particularmente em regiões específicas, como o hipocampo. Já no cerebelo sua expressão concentra-se nas células de Purkinje (SUN et al., 2004; GOLDSMITH et al., 2004; NOVAK, 2004) e na camada granular, tendo ausência de expressão na camada molecular (GOLDSMITH et al., 2004).

A isoforma de 70kD definida por Goldsmith e colaboradores (2004), apresenta localização em regiões específicas do sistema nervoso como cerebelo e córtex, possuindo em contrapartida ausência de expressão em outros tecidos como fígado, rim, músculo esquelético, coração e pulmão. Quanto à caracterização das diferenças bioquímicas entre as isoformas de ADAM23, a molécula de ADAM23^{100kDa} representa a forma imatura da proteína, enquanto ADAM23^{70kDa} corresponde à forma madura na qual o prodomínio está ausente. A remoção deste fragmento é essencial para a ativação da atividade proteolítica de várias ADAMs, este processo certamente está relacionado com funções fisiológicas deste grupo. Um exemplo é a ADAM15, expressa em larga escala na superfície celular na forma imatura, mas apta intracelularmente quando há perda do prodomínio (GOLDSMITH et al., 2004, NOVAK, 2004).

Outra grande diferença entre as duas isoformas de ADAM23 é o fato de que a ADAM23^{70kDa} é significativamente mais abundante em CGCs (células granulares cerebelares) do que a ADAM23^{100kDa} (GOLDSMITH et al., 2004).

Desta forma, o grupo de French-Constant conclui que as isoformas de ADAM23 são expressas predominantemente como proteínas de superfície celular, mas a ADAM23^{70kDa} é mais abundante na superfície celular do que a ADAM23^{100kDa} (GOLDSMITH et al., 2004).

Goldsmith e colaboradores (2004) descreveram que as ADAMs têm sido geralmente estudadas em termos de sua habilidade como enzimas proteolíticas (através de seu domínio metaloprotease) e como ligante de integrinas (através do seu domínio desintegrina), correlacionado particularmente estes importantes papéis com a função biológica do sistema nervoso central e seu respectivo desenvolvimento. Importantes exemplos podem ser descritos neste processo, como a ADAM13, onde sua função proteolítica é requerida para migração de células da crista neural em *Xenopus* (ALFANDARI et al., 1997, 2003), enquanto ADAM10 é responsável pela regulação do crescimento axonal em diferentes organismos (FAMBROUGH et al., 1996).

Essencialmente, o domínio desintegrina da ADAM23 tem sido mostrado como envolvido na adesão de neuroblastomas através da interação com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (CAL et al., 2000). Desta forma, ADAM23 provavelmente é considerada como molécula mediadora de funções biológicas por agir como receptor de proteínas de superfície celular, as integrinas. Isto leva a desencadear entre as associações celulares, cascatas de sinalização intracelular (GOLDSMITH et al., 2004).

Complementando evidências anteriores, a respeito da participação da ADAM23 no desenvolvimento neural e controle de suas funções, a literatura evidencia que a não expressão desta molécula em camundongos, desencadeia inúmeras alterações fisiológicas neurais como malformações, causando severa ataxia, tremores e morte dos animais em poucos dias. Com base nestas informações, pode-se inferir que ADAM23 tenha uma importante participação no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central (MITCHELL et al., 2001; NOVAK, 2004).

Com o objetivo de mapear a expressão temporal e espacial da desintegrina ADAM23 no sistema nervoso de camundongos foram realizados estudos imunohistoquímicos em animais E12, E14 e E16 e adultos (figuras 12-17) de forma a complementar os resultados bioquímicos já obtidos. Inicialmente para averiguar a integridade tecidual dos cortes obtidos de embriões no estágio E12 e E14, inclusive em cortes cerebrais e cerebelares de animais adultos, alguns cortes de cada material foram processados para coloração com HE (Hematoxilina e Eosina) antes de serem submetidos a ensaios imunohistoquímicos. Esta técnica de coloração foi necessária, levando-se em consideração a dificuldade de obtenção de bons cortes histológicos de embriões para imunoensaios, uma vez que tecidos em desenvolvimento são mais frágeis e sensíveis aos reagentes utilizados na confecção de lâminas histológicas. Além do mais, não é possível realizar perfusão em fêmeas grávidas e atingir adequadamente os embriões, para que estes permaneçam com órgãos em ótima integridade tecidual, pelo contrário, com a demora da chegada de fixador até estes animais em desenvolvimento, o tecido nervoso já apresenta pontos de degradação, e

como consequência deste fato, impede-se a realização dos experimentos de maneira satisfatória.

Após exposição aos corantes adequados, foram identificadas estruturas teciduais e celulares bem definidas no cerebelo (figura 09) e cérebro (figura 10) de animais adultos e em embriões E14 (figura 11). Adicionalmente, a figura 11 define a morfologia celular dos condrócitos (hipertróficos) presentes em focos de cartilagem hialina, na fase em que este tipo tecidual está sendo substituído por tecido ósseo primário para futura formação da coluna vertebral. Já a figura 09 define estruturalmente as três camadas celulares que compõem a substância cinzenta do cerebelo, sendo observado da periferia para a região medular, a camada molecular, células de Purkinje (neurônios multipolares característicos deste órgão) e camada granular, enquanto que a figura 10 evidencia morfologicamente os corpos de neurônios e núcleos de células gliais presentes no cérebro. Portanto, a verificação da preservação morfológica do corte histológico (processado em paraplast) foi utilizada como ponto de partida para a execução dos ensaios de imunohistoquímica.

Foi possível observar que o anti-ADAM23pep reconhece fortemente o antígeno protéico em regiões específicas do sistema nervoso central de embriões E12 (figura 12), E14 (figura 13) e E16 (figura 14). Ainda percebeu-se ausência de reatividade positiva em tecidos de origem não neural, tais como cartilagem (figura 15), músculo esquelético, células adiposas, tecido conjuntivo ósseo e conjuntivo não especializado (dados não mostrados), reforçando a idéia da expressão da ADAM23 restrita a tecidos neurais, como sugerido na literatura (CAL et al., 2000; SUN et al., 2004).

Resultados imunohistoquímicos em regiões do sistema nervoso central de animais adultos (figura 16) revelam ausência de reatividade nestas regiões anatômicas.

Quando tomados em conjunto, os resultados da imunohistoquímica reproduzem os achados de expressão obtidos por “Western Blotting”. A possível diminuição significativa da expressão de ADAM23 em camundongos adultos pode estar relacionada a uma acentuada proliferação de células gliais nesta idade e marcante inibição do processo mitótico em células comprometidas com a linhagem neural (neurônios). Diferentemente, estágios embrionários são marcados por progressivas alterações morfofuncionais e ondas proliferativas de células neuronais no processo de desenvolvimento do sistema nervoso. Nesta situação é que observamos uma elevada expressão da proteína ADAM23.

Durante a maturação do sistema nervoso, os neurônios produzem uma grande quantidade de sinapses (sinaptogênese). No córtex visual de ratos, a taxa de sinaptogênese aumenta a partir do 14º dia de gestação (E14) indo até décimo sexto dia pós-nascimento. A partir do 16º dia o número de sinapses estabiliza representando mais um estado de equilíbrio dinâmico do que ausência formação de novas sinapses. (PURVE & LICHTMANN, 1985). Neste contexto, ADAM23 poderia estar envolvida na formação de novas sinapses durante o desenvolvimento do cerebelo, tendo sua expressão diminuída no momento de estabilização da taxa de formação de novas sinapses.

Com estes ensaios imunohistoquímicos, ainda foi possível detectar expressão da ADAM23 de forma significativa no cerebelo de animais adultos (figura 17), evidenciando que esta proteína é essencial para a manutenção fisiológica e funcional do sistema nervoso, além do seu papel no desenvolvimento e maturação neural.

O método de revelação da reação de imunohistoquímica aqui empregado é menos sensível no reconhecimento do antígeno quando comparado com métodos

quimioluminescente e radioisotópico, o que explicaria sugestivamente a aparente ausência de expressão da proteína ADAM23 em cérebros adultos. O resultado obtido também pode ser consequência de epítomos ocultos do antígeno correspondente ao anticorpo anti-peptídeo ADAM23 durante processamento do material histológico.

Em resumo os resultados bioquímicos e imunohistoquímicos apresentados mostram-se relevantes aos aspectos relacionados à expressão diferencial da proteína ADAM23 em animais E12, E14, E16 e adultos durante o desenvolvimento, maturação e manutenção do sistema nervoso.

Dados da literatura apontam para um papel de ADAM23 associada a $\alpha_v\beta_3$, na adesão celular sobre vitronectina (CAL et al., 2000). Aparentemente esta participação de ADAM23 em adesão envolve a interação física com a integrina $\alpha_v\beta_3$ por um sítio independente do domínio RGD de forma que as duas moléculas atuam de forma sinérgica.

Levando-se em conta que nosso grupo recentemente descreveu uma correlação entre o silenciamento do gene *adam23*, por metilação, e o processo de progressão tumoral (COSTA et al., 2004, 2005), levantamos a hipótese que ADAM23 pudesse estar envolvida com a adesão celular a outras moléculas da matriz, tais como laminina, fibronectina, colágeno IV e a própria vitronectina.

Pensamos em utilizar duas linhagens derivadas de glioblastomas humanos, T98G e A172 devido a expressão diferenciada de metaloproteases de matriz (MMP's) (NAKAGAWA et al., 1996) e da ADAM23 (COSTA et al., 2005).

Para a padronização dos ensaios de adesão (GRANER et al., 2000b) utilizamos inicialmente a linhagem A172 por expressar maior quantidade de ADAM23 que a outra

linhagem (dados não mostrados, COSTA et al., 2001). Enquanto este tipo celular mostrou-se competente em aderir tanto em fibronectina (figura 18) como vitronectina (figura 19) e não apresentar atividade adesiva sobre albumina do soro bovino (BSA – figura 20), anticorpos anti-ADAM23pep não foram capazes de interferir na fenomenologia adesiva apresentada por esta linhagem (figuras 18 e 19).

Neste tipo de ensaio o bloqueio de funcionalidade da ADAM23 é perseguido com a utilização de anticorpos, os quais bloqueiam sítios ativos da molécula alvo ou ocultam indiretamente tais sítios por impedimento estérico. A ausência de bloqueio de função levou-nos a duas possibilidades. Na primeira, ADAM23 não estaria envolvida no processo de adesão pelo epítopo reconhecido pelo anti-ADAM23pep ou na segunda possibilidade o anti-ADAM23pep não se ligaria à superfície das células por se ligar a epítopo não exposto nestas condições experimentais (nativas). Os dados apresentados para “Western Blotting” sugerem que a segunda possibilidade esteja correta, uma vez que nessa técnica os antígenos estão na sua forma desnaturada. Entretanto resolvemos testar tal hipótese empregando ensaio de imunocitoquímica utilizando células A172 semeadas sobre substrato pré-tratado com vitronectina e fibronectina.

Os ensaios de imunofluorescência realizados com a linhagem A172 (figura 21), comprovam que o anti-ADAM23pep é incapaz de reconhecer a desintegrina ADAM23 em sua forma nativa ou na sua conformação transmembrânica (superfície celular) apresentada nestas condições experimentais. A incapacidade do anti-ADAM23pep em reagir com ADAM23 na superfície deste tipo celular foi confirmada por ensaios de citometria de fluxo (dados não mostrados). Tais resultados mostram que nenhuma

conclusão pode ser tomada dos ensaios de adesão uma vez que o anticorpo empregado não se liga à superfície das células A172.

Conclusivamente, ensaios bioquímicos através da precipitação protéica seqüencial de cérebro e cerebelo de camundongos E16, P6 e adultos, mostraram-se relevantes nos aspectos relacionados à expressão da ADAM23 nestes órgãos do sistema nervoso central. Adicionalmente, ensaios de imunofluorescência comprovam que o anti-ADAM23pep se comporta como um reagente não adequado frente a certas condições experimentais, o que impede seu uso satisfatório em muitos ensaios, como experimentos que envolvam a análise funcional da proteína ADAM23, especialmente ensaios de adesão e neuritogênese. Estes últimos experimentos citados faziam parte dos objetivos planejados neste trabalho, mas as propriedades do anticorpo que se dispunha inviabilizou sua utilização. Desta forma, para prosseguir com estes ensaios funcionais, seria necessário obter um reagente específico e eficaz no reconhecimento de ADAM23 tanto na sua forma nativa quanto na sua conformação desnaturada, tendo alto poder de especificidade pelo antígeno. Outro ponto que deve ser salientado em relação ao anti-ADAM23pep é a sua capacidade de apresentar reações cruzadas com outras moléculas, o que também dificulta ainda mais os experimentos, especialmente os de Western Blotting. Este fator é considerado outro motivo para se buscar a produção de reagentes mais eficazes no reconhecimento de ADAM23.

Na tentativa de solucionar o problema em questão, a próxima etapa deste trabalho foi produzir anticorpos policlonais contra um fragmento maior da proteína ADAM23 de camundongos. Como esta etapa é extremamente longa, até o momento conseguiu-se prosseguir com a clonagem e expressão de um fragmento desta extensa molécula. Toda a técnica de clonagem e expressão da ADAM23 de camundongo em

sistema heterólogo de *E. coli*, foram executadas como parte de um esforço coletivo de vários membros deste laboratório, em colaboração com integrantes do Instituto Ludwig da Pesquisa sobre o Câncer – São Paulo.

A proteína ADAM23 recombinante produzida, foi utilizada em imunoensaaios de Western Blotting com a finalidade de comprovar a especificidade do anti-ADAM23pep empregado neste estudo. Tal resultado reforça a hipótese que este anticorpo anti-peptídeo reconhece o antígeno de camundongo na forma desnaturada e que este epítipo está de algum modo oculto na conformação nativa da ADAM23. A proteína recombinante abre novas perspectivas para o grupo, tanto na geração de novos reagentes mais específicos no reconhecimento de ADAM23 como na elucidação do real papel fisiológico desta molécula no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo do mapeamento temporal e espacial da proteína ADAM23 e sua correlação com o desenvolvimento do sistema nervoso nos permitem as seguintes conclusões:

- ✓ Anticorpo anti-peptídeo ADAM23 humana reconhece o antígeno ADAM23 expresso em camundongos;
- ✓ A desintegrina ADAM23 precipita na fração 25% pela técnica de precipitação protéica sequencial com sulfato de amônio saturado $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$;
- ✓ Ensaios empregando preparação de membrana mostram que ADAM23 é mais expressa em animais recém-natos (P6) do que em adultos, sugerindo um papel desta molécula na maturação do sistema nervoso;
- ✓ Ensaios bioquímicos empregando frações 25% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ evidenciam que a expressão de ADAM23 é mais acentuada em embriões (E16) quando comparados com recém-natos e adultos, sugerindo uma possível participação no desenvolvimento do sistema nervoso;

- ✓ A proteína ADAM23 é diferentemente expressa em diferentes regiões do sistema nervoso central. O perfil de expressão se apresenta particularmente diferenciado no cérebro e no cerebelo;
- ✓ Ensaios imunohistoquímicos sugerem que a expressão da ADAM23 esteja condicionada apenas aos tecidos de origem neural.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. *Biologia Molecular da Célula*. **3^a ed, Artemed, Porto Alegre, 1999.**

ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, D.; HOFFSTRON, B.G.; DeSIMONE, D.W. Integrin $\alpha 5\beta 1$ supports the migration of *Xenopus* cranial neural crest on fibronectin. **Developmental Biology**, v. 260, n. 2, p. 449-469, 2003.

ALFANDARI, D.; WOLFSBERG, T.G.; WHITE, J.M.; DESIMONE, D.W. ADAM13: A Novel ADAM Expressed in Somitic Mesoderm and Neural Crest Cells during *Xenopus laevis* Development. **Developmental Biology**, v. 182, p. 314-330, 1997.

ALLEN, C.A.; GREEN, D.P.L The mammalian acrossome reaction: gateway to sperm fusion with the oocyte? **BioEssays**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 1997.

ARVAN, P., CAMERON, R.S., CASTLE, D. Secretory Membrane of the Rat Parotid Gland: Preparation and Comparative Characterization. **Methods Enzynol**, v. 98, p. 75-87, 1983.

BAJANCA, F.; THORSTEINDÓTTIR, S. Integrin expression patterns during early limb muscle development in the mouse. **Mechanisms of Development**, v. 119S, p. S131-S134, 2002.

BARON, W.; SHATTIL, S.J.; FFRENCH-CONSTANT, C. The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of alfa (α) beta 3 integrins. **The Embo Journal**, v. 21, n. 8, p. 1957-1966, 2002.

BEVITT, D.J.; MOHAMED, J.; CATTERALL, J.B.; LI, Z.; ARRIS, C.E.; HISCOTT, P.; SHERIDAN, C.; LANGTON, K.P.; BARKER, M.D.; CLARKE, M.P.; MCKIE, N. Expression of ADAMts metalloproteinases in the retinal pigment epithelium derived cell line ARPE-19: transcriptional regulation by TNF α . **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1626, p. 83-91, 2003.

BIGLER, D.; CHEN, M.; WATERS, S.; WHITE, J.M. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. **Cell Biology**, v. 7, p. 220-225, 1997.

BLACK, R.A.; RAUCH, C.T.; KOZLOSKY, C.J.; PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; WOLFSON, M.F.; CASTNER, B.J.; STOCKING, K.L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K.A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J.N.; JOHNSON, R.S.; PAXTON, R.J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D.P. A metalloproteinase Disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, p. 729-736, 1997.

BLACK, R.A.; WHITE, J.M. 1998 ADAMs: focus on the protease domain. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, p. 654-659, 1998.

BLOBEL, C.P.; WOLFSBERG, T.G.; TURCK, C.W.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J.M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v. 356, p. 248-252, 1992.

BOISSY, P.; LENHARD, T.R.; KIRKEGAARD, T.; PESCHON, J.J.; BLACK, R.A. DELAISSÉ, J.M.; OVEJERO, M. DEL C. An assessment of ADAMs in bone cells: absence of TACE activity prevents osteoclast recruitment and the formation of the marrow cavity in developing long bones. **FEBS Letters**, v. 553, p. 257-261, 2003.

BRACHVOGEL, B.; REICHENBERG, D.; BEYER, S.; JEHN.; MARK, K.VON DER.; BIELKE, W. Molecular cloning and expression analysis of a novel member of the Disintegrin and Metalloprotease-Domain (ADAM) family. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 288, p. 203-201, 2002.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

CAI, H.; KRÄTZSCHMAR, J.; ALFANDARI, D.; HUNNICUTT, G.; BLOBEL, C.P. Neural Crest-Specific and General Expression of Distint Metalloprotease-Disintegrins in Early *Xenopus laevis* Development. **Developmental Biology**, v. 204, p. 508-524, 1998.

CAL, S.; FREIJE, J.M.P.; LÓPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM23/MDC3, a Human Disintegrin that Promotes Cell Adhesion via Interaction with the $\alpha v \beta 3$ Integrin through an RGD-independent Mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.

CAMARERO, G.; LEON, Y.; GOROSPE, I.; DE PABLO, F.; ALSINA, B.; GIRALDEZ, F.; VARELA-NIETO, I. Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. **Developmental Biology**, v. 262, n. 2, p. 242-253, 2003.

CAMPER, L.; HEINEGARD, D.; LUNDGREN-AKERLUND, E. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ is a receptor for the Cartilage Matrix Protein Chondroadherin. **The Journal of Cell Biology**, v. 138, n. 5, p. 1159-1167, 1997.

CARLSON, B.M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

CARROLL, E.A.; GERRELLI, D.; GASCA, S.; BERG, E.; BEIER, D.; COPP, A.J.; KLINGENSMITH, J. *Cordon-Bleu* is a conserved gene involved in neural tube formation. **Developmental Biology**, v. 262, p. 16-31, 2003.

CARVALHO, H.F., RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula 2001**. 1ª ed, Manole, Tamboré, 2001.

CATTERALL, J.B., CAWSTON, T.E. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. **Arthritis Research and Therapy**, v. 5, n. 1, p. 12-14, 2003.

CEPKO, C.L., GOLDEN, J.A., SZELE, F.G., LIN, J.C. Lineage analysis in the vertebrate central nervous system. *In* W.M. Cowan, T.M. Jessel, S.L. Zipursky. Molecular and cellular approaches to neural development. **Oxford University Press, New York, 1997**.

CERRETTI, D.P.; DUBOSE, R.F.; BLACK, R.A.; NELSON, N. Isolation of Two Novel Metalloproteinase-Disintegrin (ADAM) cDNAs That Show Testis-Specific Gene Expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, p. 810-815, 1999.

CHANTRY, A.; GREGSON, N.A.; GLYNN, P. A novel Metalloproteinase Associated with Brain Myelin Membranes: Isolation and Characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 36, p. 21603-21607, 1999.

CHAVIS, P.; WESTBROOK, G. Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. **Nature**, v. 411, p. 317-321, 2001.

CHEN, M.S.; ALMEIDA, E.A.C.; HUOVILLA, A.-J.; TAKAHASHI, Y.; SHAW, L.M.; MERCURIO, A.M. Evidence that Distinct States of the Integrin $\alpha 6 \beta 1$ Interact With Laminin and an ADAM. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 3, p. 549-561, 1999.

CHEN, Z.; INDYK, J.A.; STRICKLAND, S. The Hippocampal Laminin Matrix is Dynamic and Critical for Neuronal Survival. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 2665-2676, 2003.

CHERESH, D.A.; MECHAM, R.P. **Integrins: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix**. Academic Press, San Diego, California, 1994.

CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.O.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **Embo Journal**, v. 21, p. 3317-3326, 2002.

CHOI, I.; WOO, J.-M.; HONG, S.; JUNG, Y.-K.; KIM, D.H.; CHO, C. Identification and characterization of ADAM32 with testis-predominant gene expression. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 304, p. 151-162, 2003.

CORMACK, D.H. **Fundamentos de Histologia**. 2ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

COSTA, F.F.; COLIN, C.; SHINJO, S.M.O.; ZANATA, S.M.; MARIE, S.K.N.; SOGAYAR, M.C.; CAMARGO, A.A. ADAM23 Methylation And Expression Analysis In Brain Tumors. **Neuroscience Letters**, v. 380, n. 3, p. 260-264, 2005.

COSTA, F.F.; VERBISCK, N.V.; SALIM, A. C.M.; IERARDI, D.F.; PIRES, L.C.; SASAHARA, R.M.; SOGAYAR, M.C.; ZANATA, S.M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON, A.J.G.; CAMARGO, A.A. Epigenetic Silencing of the Adhesion Molecule ADAM23 is Highly Frequent in Breast Tumors. **Oncogene**, v. 23, n. 7, p. 1481-1488, 2004.

DeHART, G.W.; HEALY, K.E.; JONES, J.C.R. The role of $\alpha 3\beta 1$ integrin in determining the supramolecular organization of laminin-5 in the extracellular matrix of keratinocytes. **Experimental Cell Research**, v. 283, p. 67-79, 2003.

DETINGER, S.K.W.; JIANG, X.; LI, Z.; MURTHY, V.N.; WHITSIDES, G.M. Gradients of Substrate-Buond Laminin Orient Axonal Specification of Neurons. **PNAS**, v. 99, n. 20, p. 12542-12547, 2002.

DOENDES, J.R.; MAHIMKAR, R.M.; BLACK, R.A. TACE/ ADAM-17 enzymatic activity is increased in response to cellular stimulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 331-338, 2003.

EVANS, J.P.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R.M. Characterization of the Binding of Recombinant Mouse Sperm Fertilin α Subunit to Mouse Eggs: Evidence for Function as a Adhesion Molecule in Sperm-Egg Binding. **Developmental Biology**, v. 187, p. 94-106, 1997a.

EVANS, J.P.; SCHULTZ, R.M.; KOPF, G.S. Characterization of the Binding of Recombinant Mouse Sperm Fertilin β Subunit to Mouse Eggs: Evidence for Adhesive Activity via an Egg $\beta 1$ Integrin-Mediated Interaction. **Developmental Biology**, v. 187, p. 79-93, 1997b.

FAMBROUGH, D.; PAN, D.; RUBIN, G.M.; GOODAN, G.S. The cell surface metalloprotease/ disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. **Neurobiology**, v. 93, p. 13233-13238, 1996.

FINGER, F.P.; KOPISH, K.R.; WHITE, J.G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. **Developmental Biology**, v. 261, p. 220-234, 2003.

GARCIA, S.M.L. & FERNANDEZ, E.J.N.C.G. **Embriologia**. Artes Médicas, Porto Alegre, 1991.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

GAULTIER, A.; COUSIN, H.; DARRIBERE, T.; ALFANDARI, D. ADAM23 Disintegrin and Cysteine-Rich Domains Bind to the Second Heparin-Binding Domain of Fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23336-23344, 2002.

GENESER, F. **Histologia**. 3ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 5ª ed, Sinauer Associates, INC. Publishers, Massachusetts, U.S.A, 1997.

GILBERT, S.F. **Biologia do Desenvolvimento**. Fundec, Ribeirão Preto, 2002.

GILL, S.E.; PAPE, M.C.; KHOKHA, R.; WATSON, A.J.; LECO, K.J. A null mutation for Tissue Inhibitor of Metalloproteases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 261, p. 313-323, 2003.

GILPIN, B.J.; LOECHEL, F.; MATTEI, M.G.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. A novel, Secreted Form of Human ADAM12 (meltrina α) Provokes Myogenesis in Vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 157-166, 1998.

GOLDSMITH, A.P.; GOSSAGE, S.J.; FFRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Central Nervous System Neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, p. 647-658, 2004.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; FORLENZA, O.V.; CABRAL, A.L.B.; VEIGA, S.S.; JULIANO, M.A.; ROESLER, R.; WALZ, R.; MINETTI, A.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Molecular, Brain Research**, v. 76, p. 85-92, 2000a.

GRANER, E.; MERCADANTE, A.F.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R.; JAY, D.G.; BRENTANI, R.R. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Letters**, v. 482, p. 257-260, 2000b.

GROOMS, S.Y.; TERRACIO, L.; JONES, L.S. Anatomical Localization of β 1 Integrin-like Immunoreactivity in Rat Brain. **Experimental Neurobiology**, v. 122, p. 253-259, 1993.

GROOME, N.; CHANTRY, A.; EARL, C.; NEWCOMBE, J.; KEEN, J.; FINDLAY, J.; GLYNN, P. A new epitope on human myelin basic protein arising from cleavage by a metalloprotease associated with brain myelin membranes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 19, p. 77-88, 1988.

GUIDATO, S.; BARRETT, C.; GUTHRIE, S. Patterning of motor neurons by retinoic acid in the chick embryo hindbrain in vitro. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 23, p. 81-95, 2003.

HALL, R.J.; ERICKSON, C.A. ADAM10: An active metalloprotease expressed during avian epithelial morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 256, p. 146-159, 2003.

HAM, C.; LEVKAU, B.; RAINES, E.W.; HERREN, B. ADAM15 is an Adherens Junction Molecule Whose Surface Expression Can Be Driven by VE-Cadherin. **Experimental Cell Research**, v. 279, p. 239-247, 2002.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies – A laboratory manual. **Col Spring Harbor Laboratory**, USA, 1998.

HE, Z.-Y.; BRAKEBUSCH, C.; FÄSSLER, R.; KREIDBERG, J.A.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. **Developmental Biology**, v. 254, p. 226-237, 2003.

HIB, J. **Di Fiori – Histologia- Texto e Atlas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

HIKITA, S.T.; CANN, G.M.; WINGERD, K.L.; MULLICK, L.H.; WAYNE, W.C.; WEBB, S.W.; CLEGG, D.O. Integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) expression and activity in retinal and peripheral neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 23, p. 427-439, 2003.

HITE, L.; JIA, L.-G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA Sequences for Four Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Classification, and Their Relationship to Mammalian Reproductive Proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n. 1, p. 182-191, 1994.

HOWARD, L.; LU, X.; MITCHELL, S.; GRIFFITHS, S.; GLYNN, P. Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. **Biochemistry Journal**, v. 317, p. 45-50, 1996.

HSIAO, K.K. From prion diseases to Alzheimer's disease. **Journal Neural Transm.**, v. 49, p. 135-144, 1997.

HU, X.; SHELVER, W.H. Docking studies of matrix metalloproteinase inhibitors: zinc parameter optimization to improve the binding free energy prediction. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, (no prelo), 2003.

HUIJSDUIJNEM, R.H.VAN. ADAM20 and 21, two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilina- α . **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 206, p. 273-282, 1998.

HUOVILA, A.P.J.; ALMEIDA, E.AC.; WHITE, J.M. ADAMs and cell fusion. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, p. 692-699, 1996.

HURSKAINEN, T.L.; HIROHATA, S.; SELDIN, M.F.; APTE, S.S. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, Novel Members of a New Zinc Metalloproteases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25555-25563, 1999.

HYNES, R.O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, p. 673-687, 2002.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.J.; LOECHEL, F.; WEWER, U.M. Cysteine-Rich Domain of Human ADAM12 (meltrin α) Supports Tumor Cell Adhesion. **American Journal of Pathology**, v. 154, n. 5, p. 1489-1501, 1999.

INOUE, D.; REID, M.; LUM, L.; KRÄTZSCHMAR, J.; WESKAMP, G.; MYUNG, Y.M.O.; BARON, R.; BLOBEL, C.P. Cloning and Initial Characterization of Mouse Meltrin β and Analysis of the Expression of Four Metalloprotease-Disintegrins in Bone Cells. **The Journal Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 4180-4187, 1998.

JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.I.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Function and Relationship to the ADAMs Family of Proteins. **Toxicon**, v. 34, n. 11/12, p. 1269-1276, 1996.

JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Inhibition of Platelet Aggregation by the Recombinant Cysteine-Rich Domain of the Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinase, Atrolysin A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 281-286, 2000.

JONES, L.S.; GROOMS, S.Y. Normal and Aberrant Functions of Integrins in the Adult Central Nervous System. **Neurochemistry International**, v. 31, N. 4, p. 587-595, 1997.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Essentials of Neural Science and Behavior. **Appleton & Lange**, United States of America, 1995.

KÄRKKÄINEN, L.; RYBNIKOVA, E.; PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.P. Metalloprotease-Disintegrin (ADAM) Genes are Widely and Differentially Expressed in the Adult CNS. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 547-560, .2000.

KINI, R.M. Do we know the Complete Sequence of Metalloproteinase and Nonenzymatic Platelet Aggregation inhibitor (Disintegrin) precursor Proteins? **Toxicon**, v. 33, n. 9, p. 1151-1160, 1995.

KINI, R.M.; ZHANG, C.Y.; TAN, B.K.H. Pharmacological Activity of the Interdomain Segment Between Metalloproteinase and Disintegrin Domains. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 529-535, 1997.

KOO, E.H.; PARK, L.; SELKOE, D.J. Amyloid β - as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 190, p. 4748-4752, 1993.

KRÄTZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C.P. Metargidin, a Membrane-anchored Metalloprotease-Disintegrin Protein With an RGD Integrin Binding Sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 9, p. 4593-4596, 1996.

KREIDBERG, J.A., SYMONS, J.M. (2000). Integrins in Kidney development, function, and disease. **American Journal Physiological Renal**, v. 279, p. F233-F242, 2000.

KUNO, K.; KANADA, N.; NAKASHIMA, E.; FUJIKI, F.; ICHIMURA, F.; MATSUSHIMA, K. Molecular cloning of a Gene Encoding a New Type of Metalloproteinase-disintegrin Family Protein with Thrombospondin Motifs as an Inflammation Associated Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 556-562, 1996.

KURISAKI, T.; WAKATSUKI, S.; SEHARA-FUJISAWA, A. Meltrin β is a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuroal cells. **FEBS Letters**, v. 532, p. 419-422, 2002.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, p. 1-10, 2001.

LIU, L.; SMITH, J.W. Identification of ADAM31: A Protein Expressed in Leydig Cells and Specialized Epithelia. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 2033-2042, 2000.

LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P., DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 3^a ed, Scientific American Books, New York, 1998.

LOECHEL, F.; GILPIN, B.J.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. Human ADAM12 (meltrin α) is an Active Metalloprotease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 27, p. 16993-16997, 1998.

LOECHEL, F.; OVERGAARD, M.T.; OXVIG, C.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U.M. Regulation of Human ADAM12 Protease by the Prodomain – Evidence for a Functional Cysteine Switch. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13427-13433, 1999.

LUCKENBILL-EDDS, L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. Brain Res. Rev., **v.23, p. 1-27, 1997.**

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.DE; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1376-1382, 1997.

MARTINS, V.R.; LINDEN, R.; PRADO, M.A.M.; SAKAMOTO, A.C.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R.R. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Letters** *no prelo.* 2002.

MARTINS, V.R.; MERCADANTE, A.F.; CABRAL, A.L.; FREITAS, A.R.; CASTRO, R.M. Insights into the physiological function of cellular prion protein. **Braz J Med Res.**, v.34, n. 5, p. 585-595, 2001.

McKIE, N.; EDWARDS, T.; DALLAS, D.J.; HOUGHTON, A.; STRINGER, B.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G.; CROUCHER, P.I. Expression of members of a novel membrane linked metalloproteinase family (ADAM) in human articular chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 230, n. 2, p. 335-339, 1997.

MITCHELL, K.J.; PINSON, K.I.; KELLY, O.G.K.; BRENNAN, J.; ZUPICICH, J.; SCHERZ, P.; LEIGHTON, P.A.; GOODRICH, L.V.; LU, X.; AVERY, B.J.; TATE, P.; DILL, K.; PANGILINAN, E.; WAKENIGHT, P.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SKARNES, W.C. Functional Analyses of Secreted and Transmembrane Proteins Critical to Mouse Development. **Nature Genetics**, v. 28, p. 241-249, 2001.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. Tradução da 7ª edição americana, Elsevier, Rio de Janeiro, 2004.

NAKAGAWA, T.; KUBOTA, T.; KABUTO, M.; FUJIMOTO, N.; OKADA, Y. Secretion of matrix metalloproteinase-2 (72kD gelatinase/ type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 28, p. 113-124, 1996.

NATH, D.; SLOCOMBE, P.M.; WEBSTER, A.; STEPHENS, P.E.; DOCHERTY, A.J.P.; MURPHY, G. Meltrin γ (ADAM9) Mediates Cellular Adhesion Through $\alpha 6 \beta 1$ Integrin, Leading to a Marked Induction of Fibroblast Cell Motility. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 2319-2328, 2000.

NIKONENKO, I.; TONI, N.; MOOSMAYER, M.; SHIGERI, Y.; MULLER, D.; JONES, L.S. Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, and adhesion in the postnatal brain. **Developmental Brain Research**, v. 140, p. 185-194, 2003.

NISHIWAKI, K.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K. A Metalloprotease Disintegrin that Controls Cell Migration in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 288, p. 2205-2208, 2000.

NOVAK, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 03, p. 227-235, 2004.

PINKSTAFF, J.K.; DETTERICH, J.; LYNCH, G.; GALL, C. Integrin Subunit Gene Expression is Regionally Differentiated in Adult Brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 5, p. 1541-1556, 1999.

PLAMONT, M.-A.; CHASSEIGNEAUX, S.; DELASNERIE-LAUPRÊTRE, N.; BEAUDRY, PATRICE.; PEOC'H, K.; LAPHANCHE, J.-L. Variation at the ADAM10 gene locus is not associated with Creutzfeldt-Jakob disease. **Neuroscience Letters**, v. 344, p. 132-134, 2003.

POINDEXTER, K.; NELSON, N.; DUBOSE, R.F.; BLACK, R.A.; CERRETTI, D.P. The identification of seven metalloproteinase-disintegrin (ADAM) genes from genomic libraries. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 237, p. 61-70, 1999.

PURVES, D. & LICHTMANN, J.W. Principles of neural development. Sinauer Associates Inc., **1985**

QUARANTA, V.; JONES, J.C.R. The Internal affairs of an integrin. **Trends in Cell Biology**, v. 1, p. 2-4, 1991.

RIIKONEN, T.; WESTERMARCK, J.; KOIVISTO, L.; BROBERG, A., KÄHÄRI, V.M.; HEINO, J. Integrin $\alpha 2\beta 1$ is a positive regulator of Collagenase (MMP-1) and Collagen $\alpha 1$ (I) Gene Expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 22, pp. 13548-13552, 1995.

RISE, M.; BURKE, R.D. SpADAM, a sea urchin ADAM, has conserved structure and expression. **Mechanisms of Development**, v. 117, p. 275-281, 2002.

ROESLER, R.; WALZ, R.; QUEVEDO, J.; DE-PARIS, F.; ZANATA, S.M.; GRANER, E.; IZQUIERDO, I.; MARTINS, V.R.; BTANI, R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP^C. **Molecular Brain Research**, v. 71, p. 349-353, 1999.

ROGHANI, M.; BECHERER, J.D.; MOSS, M.L.; ATHERTON, R.E.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; ARRIBAS, J.; BLACKBURN, R.K.; WESKAMP, G.; TEMPEST, P.; BLOBEL, C.P. Metalloprotease-Disintegrin MDC9: Intracellular Maturation and Catalytic Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3531-3540, 1999.

RYBNIKOVA, E.; KÄRKKÄINEN, PELTO-HUIKKO, M.; HUOVILA, A.-P.J. Developmental Regulation and Neural Expression of the Cellular Disintegrin ADAM11 Gene in Mouse Nervous System. **Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 921-934, 2002.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochemistry Journal**, v. 334, p. 93-98, 1998.

SAGANE, K.; YAMAZAKI, K.; MIZUI, Y.; TANAKA, I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 236, p. 79-86, 1999.

SAITO, S.; FUJITA, T.; KOMIYA, Y.; IGARASHI, M. Biochemical characterization of nerve growth cones isolated from both fetal and neonatal rat forebrains: the growth cone particle fraction mainly consists of axonal growth cones in both stages. **Developmental Brain Research**, v. 65, p. 179-184, 1992.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboraroty manual**, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA, v.3, 2001.

SCHLOMANN, U.; RATHKE-HARTLIEB, S.; YAMAMOTO, S.; JOCKUSCH, H.; BARTSCH, J.W. Tumor Necrosis Factor α induces a Metalloprotease-Disintegrin, ADAM8 (CD156): Implications for Neuron-Glia Interactions during Neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 21, p. 7964-7971, 2000.

SCHLÖNDORFF, J.; BLOBEL, C.P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering by protein-ectodomain shedding. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 3603-3617, 1999.

SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins functions. **Genes & Development**, v. 17, p. 7-30, 2003.

SELKOE, D.J. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. **Cell Biology**, v. 8, p. 447-452, 1998.

SMITH, K.M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; ALFANDARI, D.; WHITE, J.M.; DeSIMONE, D.W. The Cysteine-Rich Domain Regulates ADAM Protease Function in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v. 159, n. 5, p. 893-902, 2002.

STRACHAN, L.R.; CONDIC, M.L. Neural crest motility and integrin regulation are distinct in cranial and trunk populations. **Developmental Biology**, v. 259, p. 288-302, 2003.

SUN, Y.P.; DENG, K.J.; WANG, F.; ZHANG, J.; HUANG, X.; QIAO, S.; ZHAO, S. Two novel isoforms of *ADAM23* expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene: An International Journal on Genes and Genomes**, v. 325, p. 171-178, 2004.

TAKADA, Y.; YLÄNNE, J.; MANDELMAN, D.; PUZON, W.; GINSBERG, M.H. A Point Mutation of Integrin $\beta 1$ Subunit Blocks Binding of $\alpha 5\beta 1$ to Fibronectin and Invasin but not recruitment to adhesion Plaques. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 4, p. 913-921, 1992.

TAKAGI, J.; KAMATA, T.; MEREDITH, J.; PUZON-MCLANGHLIN, W.; TAKADA, Y. Changing Ligand Specificities of $\alpha v\beta 3$ Integrins by Swapping a Short Diverse Sequence of the β subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 32, p. 19794-19800, 1997.

TOMASELLI, K.J. & REICHARDT, L.F. Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function. **Journal Neuroscience Research** v. 21, p. 275-285, 1988.

TOMASELLI, K.J., HALL, D.E., FLIER, L.A., GEHLSSEN, K.R., TUMER, D.C., CARBONETTO, S. & REICHARDT, L.F. A neuronal cell line (PC12) expresses two – class integrins – $\alpha 1$ and $\alpha 3$ that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. **Neuron**, v. 5, p. 651-662, 1990.

TOMVZUK, M.; TAKAHASHI, Y.; HUANG, J.; MURASE, S.; MISTRETTA, M.; KLAFFKY, E.; SUTHERLAND, A.; BOLLING, L.; COONROD, S.; MARCINKIEWICZ, C.; SHEPPARD, D.; STEPP, M.-A.; WHITE, J.M. Role of multiple β 1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3. **Experimental Cell Research**, v. 290, p. 68-81, 2003.

WATANABE, T.; SENDO, F. Physical association of β 2 integrin with GPI-80, a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored prote with potential for regulating adhesion and migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p. 692-694, 2002.

WECHSLER-REYA, R.J. Caught in the matrix: how vitronectin controls neuronal Differentiation. **Trends in Neurosciences**, v. 24, p. 680-2, 2001.

WERB, Z. ECM and Cell Surface Proteolysis: Regulating Cellular Ecology. **Cell**, v. 91, p. 439-442, 1997.

WESKAMP, G.; BLOBEL, C.P. A Family of Cellular Proteins Related to Snake Venom Disintegrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 2748-2751, 1994.

WESKAMP, G.; CAI, H.; BRODIE, T.A.; HIGASHYAMA, S.; MANOVA, K.; LUDWIG, T.; BLOBEL, C.P. Mice Lacking the Metalloprotease-Disintegrin MDC9 (ADAM9) Have no Evident Major Abnormalities during Developmental or Adult life. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 5, p. 1537-1544, 2002.

WHITE, J.M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 1-9, 2003.

WOLFE, S.L. **Molecular and Cellular Biology**. Wadsworth Publishing Company, Califórnia, 1993.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, n. 2, p. 275-278, 1995.

WOLPERT, L., BEDDINGTON, R., BROCKES, J., JESSEL, T., LAWRENCE, P., MEYEROWITZ, E. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Artemed, Porto Alegre, 2000.

WU, E.; CROUCHER, P.I.; MCKIE, N. Expression of Members of the Novel Membrane Linked Metalloproteinase Family ADAM in Cells Derived from a Range of Haematological Malignancies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, p. 437-442, 1997.

YAGAMI-HIROMASA, T.; SATO, T.; KURISAKI, T.; KAMIJO, K.; NABESHIMA, Y.; FUJISAWA-SEHARA, A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. **Nature**, v. 377, p. 652-656, 1995.

YUAN, R.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. A Role for the Disintegrin Domain of Cyritestin, a Eperm Surface Protein Belonging to the ADAM Family, in Mouse Sperm-Egg Plasma Membrane Adhesion and fusion. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 1, p. 105-112, 1997.

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.N.M.; CHIARINI, L.B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A.R.O.; CABRAL, A.L.B.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; OLIVEIRA, E.DE; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **Embo Journal**, v. 21, p. 3307-3316, 2002a.

ZHANG, X.-P.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. Specific Interaction of the Recombinant Disintegrin-like Domain of MDC-15 (Metargidin, ADAM-15) with Integrin $\alpha v \beta 3$. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7345-7350, 1998.

ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J.B. The Hemorrhagin Catrocollastatin Inhibits Collagen-Induced Platelet Aggregation by Binding to Collagen via Its Disintegrin-like Domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, p. 720-726, 1996.

ZHU, P.C.; SUN, Y.; XU, R.; SANG, Y.; ZHAO, J.; LIU, G.; CAI, L.; LI, C.; ZHAO, S. The interaction between ADAM22 e 14-3-3 ξ : regulation of cell adhesion and spreading. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 991-999, 2003.

ZIGMOND, M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L., SQUIRE, L.R. **Fundamental Neuroscience**. Academic Press, San Diego, Califórnia, 1999.

1.SOLUÇÕES

1.1 SOLUÇÃO DE NaCl 4M

- ✓ NaCl.....116,88g
- ✓ H₂O Milliq.....q.s.p. 500ml

1.2 SOLUÇÃO Tris HCl 1M pH7,4

- ✓ Tris HCl.....60,57g
- ✓ H₂O Milliq.....q.s.p. 500ml

*Corrigir pH com HCl

1.3 SOLUÇÃO Lower Gel Buffer (LG-B) pH8,8

- ✓ Tris 1,5M 181,71g 90,85g (½L)
- ✓ SDS 4g..... 2g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.1L500ml

*Corrigir pH com HCl

Obs.: SDS deve ser pesado com máscara (irritante).

1.4 SOLUÇÃO Upper Gel Buffer (UG-B) pH6,8

- ✓ Tris 1M121,14g60,57g (½L)
- ✓ SDS 0,4%.....4g.....2g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....1L500ml

*Corrigir pH com HCl

Obs.: SDS deve ser pesado com máscara (irritante).

1.5 ACRILAMIDA 30%

- ✓ Bisacrilamida.....8g
- ✓ Acrilamida.....300g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....1L

Obs.: Colocar acrilamida e bisacrilamida em um Becker, completar para 900ml de H₂O Milliq. Filtrar a mistura e completar o volume para 1000ml de solução em uma proveta.

1.6 PBS 1x pH 7,4

- ✓ NaCl (140mM).....2,047g
- ✓ KCl (2,7mM).....0,502g
- ✓ Na₂HPO₄ (8mM).....0,284g
- ✓ KH₂PO₄ (1,5mM).....0,051g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....250ml

Obs.: Calibrar pH para 7,4.

Esta solução pode ser autoclavada ou filtrada.

1.7 SOLUÇÃO DESTAINING

- ✓ H₂O Milliq.....675 ml
- ✓ Etanol.....250ml
- ✓ Ácido Acético Glacial.....75ml

1.8 TAMPÃO DE AMOSTRA 4X

- ✓ Tris HCl pH6,8 1M.....2,4ml
- ✓ Glicerol.....4,0ml
- ✓ SDS.....0,8mg
- ✓ H₂O MilliQ q.s.p.....10ml
- Tris HCl e glicerol (homogeneizar)
- Colocar H₂Odd até 8ml, adicionar SDS e depois completar o volume de H₂Odd para 10ml

1.9 TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA (PARA TANQUE)

- ✓ Glicina.....57,65g.....43,238g
- ✓ Tris.....12,114g.....9,086g
- ✓ SDS 10%.....15ml (adicionar por último!).....11,25ml
- ✓ Metanol 20%.....800ml.....600ml
- ✓ H₂Odd MilliQ q.s.p.....4000ml.....3000ml

*Após a transferência, armazenar no garrafão e a 4°C. Pode ser reaproveitado até 90-100mÅ. Quando o tampão é novo, o correto é até 60-70mÅ, v. const. 25V.

1.10 TAMPÃO DE CORRIDA 10X

- ✓ Tris.....30,3g
- ✓ Glicina.....144g
- ✓ SDS.....10g
- ✓ H₂O MilliQ q.s.p.....1000ml

* Utiliza-se tampão 1x para corrida!

1.11 PBS 10X PH 7,4

- ✓ NaCl..... 40g
- ✓ KCl.....1g
- ✓ Na₂HPO₄.....7,2g
- ✓ KH₂PO₄.....1,2g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....500ml

*Ajustar pH para 7,4.

1.12 FORMALDEÍDO 8%

- ✓ Paraformaldeído (8%).....8g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....100ml

Procedimento: aquecer um pouco de H₂O Milliq (60/ 65°C) e acrescentar o pó de paraformaldeído (8g). Acrescentar NaOH 1M até a solução ficar transparente. Filtrar se necessário.

1.13 IODOCETAMIDA 1M

- ✓ Iodocetamida.....1,85g
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....10ml

1.14 PHENANTHROLINA 1M

- ✓ 2,4Phenanthrolina.....1,98g
- ✓ Etanol q.s.p.....10ml

1.15 TAMPÃO TBST 0,05%

- ✓ NaCl.....120mM
- ✓ Tris HCl pH 7,4 1M.....10ml
- ✓ Tween 20.....0,05%
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.....1000ml

* Adicionar Tween 20 por último.

2.CORANTES

2.1 PONCEAU

- ✓ Ponceau (0,2%).....0,4g
- ✓ Ácido acético (3%).....6ml
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.200 ml

2.2 AZUL DE COOMASSIE

- ✓ Etanol.....200ml
- ✓ Ácido acético.....50ml
- ✓ Azul de Coomassie.....01 tablete
- ✓ H₂O Milliq q.s.p.500ml

2.3 HEMATOXILINA DE HARRIS

- ✓ Alúmen de potássio ou amônio.....20g
- ✓ Hematoxilina.....1g

- ✓ Óxido de mercúrio amarelo.....0,5g
- ✓ Álcool 95% P.A.....10ml
- ✓ Ácido acético.....5ml
- ✓ H₂O MilliQ q.s.p.200ml

Procedimento: Aquecer a água MilliQ, retirar do fogo e misturar o alúmen de potássio (no agitador). Deixar em repouso de um dia para o outro. Dissolver a hematoxilina no álcool (estufa 56°C ou em banho-maria). Misturar as duas soluções. Adicionar óxido de mercúrio e deixar ferver por 5 minutos. Dar um choque térmico, colocando para esfriar em água corrente (com gelo). Filtrar e adicionar ácido acético.

2.4 EOSINA 1%

- ✓ Álcool 95% P.A.....80ml
- ✓ Eosina amarela.....1g
- ✓ H₂O MilliQ q.s.p.20ml

2.5 EOSINA ÚTIL

- ✓ Álcool 80% P.A.....75ml
- ✓ Eosina 1%.....25ml
- ✓ Ácido acético.....0,5ml

3. MEIOS DE CULTURA

3.1 MEIO MEM OU DMEM

- ✓ Meio MEM ou DMEM.....01 frasco
- ✓ Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).....2,2g
- ✓ Hepes (15mM).....2,5g
- ✓ Vermelho de fenol.....0,011g
- ✓ Garamicina.....40mg
- ✓ H_2O MilliQ recém deionizada q.s.p.....1000 ml

Acertar pH para 7,2 e depois proceder para a filtração.

Verificar o conteúdo do frasco e as instruções para certificar se o mesmo já contém ou não bicarbonato e hepes.

4. PROTOCOLOS

4.1 PREPARO DE LÂMINAS COM ORGANOSILANO

- ✓ Lavar as lâminas com detergente e enxaguar bastante
- ✓ HCl 1M – 20 minutos
- ✓ Água destilada – 3x de 15 minutos
- ✓ Acetona P.A. – 20 minutos
- ✓ Secar em temperatura ambiente
- ✓ Imersão rápida em organocilano 2% em acetona P.A. – 4x
- ✓ Imersão rápida em acetona P.A. – 4x
- ✓ Imersão rápida em água destilada – 2x
- ✓ Secar em temperatura ambiente

4.2 INCLUSÃO DE MATERIAL EM PARAPLAST

- ✓ Coletar material
- ✓ Fixar 2h em PFA4% (tempo conforme o material)
- ✓ Álcool 50% - 10 minutos
- ✓ Álcool 70% - 10 minutos
- ✓ Álcool 80% - 10 minutos
- ✓ Álcool 90% - 10 minutos
- ✓ Álcool 95% - 10 minutos
- ✓ Álcool 100% I - 10 minutos
- ✓ Álcool 100% II - 10 minutos
- ✓ Álcool 100% III - 10 minutos
- ✓ Xilol I – 5 minutos
- ✓ Xilol II – 5 minutos
- ✓ Xilol III – 5 minutos
- ✓ Paraplast I – 30 minutos
- ✓ Paraplast II – 30 minutos
- ✓ Paraplast III – 30 minutos
- ✓ Incluir e esperar o bloco esfriar
- ✓ Deixar no freezer
- ✓ Depois de estar bem gelado – TRIMAR
- ✓ Gelar bem e cortar

4.3 COLORAÇÃO DE MATERIAL EM H.E.

✓ **Desparafinização:**

- Xilol I – 20 minutos
- Xilol II – 20 minutos

✓ **Rehidratação:**

- Álcool 100% I - 5 minutos
- Álcool 100% II - 5 minutos
- Álcool 95% - 5 minutos
- Álcool 90% - 5 minutos
- Álcool 80% - 5 minutos
- Álcool 70% - 5 minutos
- Álcool 50% - 5 minutos
- H₂O destilada – 5 minutos

✓ **Coloração:**

- Hematoxilina filtrada – 1 a 2 minutos
- Lavar em água corrente
- Deixar em água destilada por 10 minutos
- Eosina – 3 a 4 minutos
- Lavar rapidamente em água corrente

✓ **Desidratação:**

- Álcool 90% - 3 minutos
- Álcool 100% I - 3 minutos
- Álcool 100% II - 3 minutos

✓ **Diafanização:**

- Xilol I – 5 minutos
- Xilol II – 5 minutos

✓ **Montar com permount**

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

✓ **Desparafinização:**

- Xilol I – 30 minutos
- Xilol II – 30 minutos

✓ **Rehidratação:**

- Álcool 100% I - 5 minutos
- Álcool 100% II - 5 minutos
- Álcool 100% III- 5 minutos
- Álcool 90% - 3 minutos
- Álcool 80% - 3 minutos
- Álcool 70% - 3 minutos
- Álcool 50% - 5 minutos
- H₂O destilada – 5 minutos

✓ **Banhos:**

- 2x de 5 minutos em PBS1X

✓ **Bloqueio da peroxidase endógena:**

- H₂O₂ a 1% em PBS1X – 15 minutos

✓ **Banhos:**

- 2x de 5 minutos em PBS1X

✓ **Bloqueio de sítios inespecíficos:**

- PBS1X + BSA 1% - 30 minutos em temperatura ambiente

✓ **Incubação com anticorpo primário:**

- Deve ser feita a 4°C (geladeira) em câmara úmida overnight
- Diluir anticorpo primário em solução de PBS1X + 0,1% de BSA
- Colocar 200µl por lâmina
- O controle negativo é feito com soro normal de coelho na mesma diluição

✓ **Banhos:**

- 2x de 5 minutos em PBS1X

✓ **Bloqueio de sítios inespecíficos:**

- PBS1X + BSA 1% - 15 minutos em temperatura ambiente

✓ **Incubação com anticorpo secundário:**

- Deve ser feita temperatura em câmara úmida por 90 minutos
- Diluir o anticorpo secundário em solução salina de PBS1X
- Colocar 200µl por lâmina

✓ **Banhos:**

- 2x de 5 minutos em PBS1X

✓ **Revelação da peroxidase com DAB:**

- Deve ser feita a temperatura ambiente em câmara úmida no escuro
- Tratar com PBS1X + DAB (0,05%) + H₂O₂ (0,01%) – 10 minutos
- Controlar o tempo pela intensidade de reação

✓ **Banhos:**

- 2x de 5 minutos em PBS1X
- 2x de 5 minutos com água destilada

✓ **Coloração:**

- Corar 20 segundos com hemetoxilina
- Lavar e deixar de molho em água destilada por 10 minutos

✓ **Desidratação:**

- Álcool 50% - (2 trocas de 3 minutos)
- Álcool 70% - (1 troca de 3 minutos)
- Álcool 80% - (1 troca de 3 minutos)
- Álcool 90% - (1 troca de 3 minutos)
- Álcool 95% - (2 trocas de 3 minutos)
- Álcool 100% - (3 trocas de 3 minutos)

✓ **Diafanização:**

- Xilol I – 5 minutos
- Xilol II – 5 minutos

✓ **Montar com permount**

4.5 INCLUSÃO DE MATERIAL EM PARAPLAST

- ✓ Aplicar Matrigel (30µg/ml) – overnight
- ✓ Lavar 1x com PBS1X
- ✓ Bloqueio da inespecificidade com BSA1% - 1hora a 37°C
- ✓ Lavar 3x com PBS1X
- ✓ Adicionar meio (DMEM) sem soro aos poços
- ✓ Deixar a placa com meio até colocar as células
- ✓ Colocar 100µl de meio + células (10^5) + anticorpo nos poços
- ✓ Incubar as células com o anticorpo – 45 minutos (37°C)
- ✓ Lavar 3x com PBS1X
- ✓ Fixar células com 3% de PFA em PBS1X – 10 minutos (37°C)
- ✓ Lavar com metanol 2% em água destilada – 10 minutos (37°C)
- ✓ Corar com 0,5% cristal violeta em 20% de metanol – 10 minutos (37°C)
- ✓ Lavar 1X com água destilada
- ✓ Eluir com 0,1M de NaCitrato pH 4,2 + 50% de etanol
- ✓ Transferir eluido para outros poços
- ✓ Leitura em espectrofotômetro com filtro de 550nm.

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

- ✓ Utilizar placa de 24 poços (nova)
- ✓ Colocar uma lamínula em cada poço (*coverlips*)
- ✓ Semear a quantidade estimada de células por poço
- ✓ Colocar na estufa a 37°C – 30 minutos
- ✓ Acrescentar 500µl de meio com 10% de SFB
- ✓ Deixar as células em cultura por 5 a 6 dias
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril
- ✓ Fixar células com PFA 2% - 30 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril
- ✓ Bloqueio de sítios aldeídicos com glicina 0,1M – 5 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril
- ✓ Transpor as lamínulas para outra placa já com 300µl de PBS1X
- ✓ Bloquear inespecificidade com BSA1% em PBS1X – 30 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril
- ✓ Incubar anticorpo primário na solução de bloqueio – 1h a temperatura ambiente – câmara úmida
- ✓ Bloquear inespecificidade com BSA1% em PBS1X – 30 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril

- ✓ Incubar anticorpo secundário na solução de bloqueio – 50 minutos a temperatura ambiente – câmara úmida e protegida da luz
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril
- ✓ Corar núcleo com DAPI – 5 minutos a temperatura ambiente
- ✓ Lavar 10X com PBS1X – estéril
- ✓ Lavar lamínulas rapidamente em água MilliQ
- ✓ Montar com Fluoromount G
- ✓ Deixar a 4°C e protegido da luz.